

Thesis

MUNICH

1964

✓
Ex

UNTERSUCHUNGEN ZUR VARIABILITÄT
DER KULTURMORPHOLOGIE
VON MYCOBACTERIUM AVIUM

ANNEMARIE CÖLLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154022_0045

Franz Frank ■ Fotodruck – Formulare – Dissertationen ■

8 MÜNCHEN 23
Werneckstrasse 27
☎ 34 36 51

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ZUR VARIABILITÄT DER KULTURMORPHOLOGIE
VON MYCOBACTERIUM AVIUM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Annemarie Cölle
aus
Rotenburg/Hann.

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. KOTTER

Referent: Prof. Dr. A. MAYR

Tag der Promotion: 28. Juli 1964

Meiner lieben Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG

II. LITERATUR

A. Allgemeines über die Dissoziation der Bakterien

- 1.) Definition und Vorkommen
- 2.) Ursachen und Beeinflussung
- 3.) Folgen der Dissoziation

B. Die Kulturmorphologie der Mycobakterien

- 1.) Die Kolonieform
- 2.) Ursachen und Eigenschaften der Kolonieformen
- 3.) Kolonieform und Virulenz

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methodik

- 1.) Material
- 2.) Methodik

B. Versuchsergebnisse

- 1.) Vorversuche
- 2.) Hauptversuche (kulturelle Untersuchungen)
- 3.) Hauptversuche (cytochemische und tier-experimentelle Untersuchungen)

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

A. Charakteristik der Versuchsstämme

B. Variantenbildung oder Dissoziation?

C. Kolonimorphologie und Virulenz

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Nachdem der Rindertuberkulose erfolgreich begegnet wurde, ist das Problem der Geflügeltuberkulose und damit das *Mycobacterium avium* in den Vordergrund getreten. Untersuchungen an dieser Keimart haben u. a. gezeigt, daß zwischen einzelnen Stämmen koloniemorphologische Unterschiede vorkommen. Eine koloniemorphologische Variantenbildung ist bei verschiedenen Keimarten schon beobachtet und auch näher untersucht worden. Man weiß, daß dauerhafte morphologische Kolonievariationen, die auch als Dissoziation bezeichnet werden, von Einfluß auf die Antigenität und die Virulenz von Krankheitserregern sein können. Über die Bedeutung der kulturmorphologischen Variantenbildung bei *Mycobacterium avium* ist man sich jedoch noch nicht im klaren.

Mir wurde deshalb die Aufgabe übertragen, die Kulturmorphologie des *M. avium* zu untersuchen und zu prüfen, ob Beziehungen zu den Dissoziationsformen anderer Species bestehen.

II. LITERATUR

A. ALLGEMEINES ÜBER DIE DISSOZIATION VON BAKTERIEN

1.) Definition und Vorkommen

Die bakterielle Dissoziation wurde zuerst von Arkwright (1) 1920 bei Keimen der Coli-enteritidis-Gruppe beobachtet und beschrieben. Er erhielt aus einem Bakterienstamm zwei Formen, die Unterschiede in ihren kulturellen Eigenschaften auf festen und in flüssigen Nährmedien sowie in ihrem Verhalten in physiologischer Kochsalzlösung aufwiesen. Diese zwei Formen benannte der Verfasser nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild als "S-Form" und als "R-Form". Die "S-Form" (von smooth = glatt) bildet kupelartige, runde, glatte, feucht glänzende und cremig ausschauende Kolonien, die sich gut verreiben lassen und in physiologischer Kochsalzlösung nicht agglutinieren. Flüssiges Nährmedium wird durch die Keime der S-Form getrübt, ohne daß sich aber Ablagerungen bilden. Als "R-Form" spricht Arkwright Kolonien an, die ein rauhes ("R" = rough = rau) Aussehen besitzen. Sie sind flach, mit unregelmäßigem, gezacktem Rand, zu dem vom Zentrum her Stränge in Form von Locken und Schleifen hin verlaufen. Die Oberfläche erscheint trocken und reliefartig. Solche Kolonien lassen sich schwer vom Nährboden abheben und verreiben. Aufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung sind instabil. Nährbouillon bleibt klar, doch bilden sich dicke Ablagerungen und evtl. ein Schleimzopf am Boden.

1921 beobachtete De Kruif (31) den von Arkwright beschriebenen Formenwechsel ebenfalls.

Hadley (20) definierte als Dissoziation, das Auftreten von Mutationen in einer Bakterienreinkultur, die sich in mehreren Merkmalen von der Ausgangskultur unterscheiden.

Nach dieser Formulierung sind auch die 1912 von Baerthelein (4) in seiner Arbeit "Über Mutationserscheinungen bei Bakterien" beschriebenen "Varitäten" als Dissoziationsformen anzusprechen. Dissoziationsähnliche Erscheinungen werden unter anderem beobachtet bei Salmonella-, Brucella- und Shigellaarten, der Coli-Gruppe, Micrococcus aureus,

Erysipelothrix rhusiopathiae, *Pasteurella septica*, *Hämophilus influenza*.

Zwischen R- und S-Typen werden natürlich auch Übergänge und Abweichungen beobachtet, die aber in der Regel einer der beiden großen Gruppen zugeordnet werden können.

So unterscheidet man Z.B. bei den Streptokokken M--- MS--- S--- SR--- RS--- und R-Formen. Bei den Brucellen werden außer R- und S- noch eine "M-" (mucoid) und eine "I-" (intermediär) Form beschrieben (40). Bei Salmonellen berichtet Caselitz (12) von einer "Ü-Form", die er neben "R" und "S" fand und Kauffmann (26) bezeichnete eine dritte Form als "T- (transient)" Form. Die T-Variante soll anstelle der normalen O-Antigene, andere, noch unbekannte T-Antigene enthalten. Die T-Formen erscheinen morphologisch als Glattformen, ihre Polysaccharide sollen aber denen der Rauformen entsprechen.

Die Mycobakterien werden von Fregnan und Smith (15) koloniemorphologisch eingeteilt in Rough-Cs, Rough-R, Rough-A, Smooth-S, Smooth-T, Smooth-D, Smooth-I, u.s.w..

2.) Ursachen und Beeinflussung

Die Ursachen, die zu einer Variation der Koloniemorphologie führen können, hat man besonders bei den Salmonellen und Brucellen eingehend untersucht. Bei den Salmonellen hat man gefunden, daß die S--- R-Variation bedingt ist durch den Verlust des Polysaccharidenthaltenden O-Antigens, das die charakteristische Oberflächenbildung der S-Form ausmacht. Die R-Form enthält einen eigenen, aber anders gearteten Polysaccharidbestandteil. Die vergleichende Analyse der Polysaccharide von Salmonellen-S- und -R-Formen ergibt, daß bei den R-Formen regelmäßig ein chromatographisch rascher wandernder Zuckerbaustein fehlt. Auf Grund dieser Analysen kann man die R-Varianten gegenüber den S-Varianten nach Lüderitz, Kauffmann, Stierlin und Westphal (32) als Verlust-Mutanten (Minus-Varianten) ansehen.

Die Beeinflussung des Dissoziationsgeschehens gelang Griffith (19) dadurch, daß er zu rauen Stämmen abgetötete glatte Kulturen zugab. Da-

durch erzielte er wieder eine teilweise Umwandlung in S-Formen. Reusse (43) fügte sterile Filtrate alter Brucellosekulturen frischen Bouillonkulturen hinzu und erreichte eine intensivere Dissoziation. Er bestätigte damit Befunde von Braun (10).

Braun (10) berichtete, daß Alanin das Wachstum von S-Zellen in hohem Maße unterdrücken soll, das der Nicht-S-Zellen dagegen kaum. Sanders und Huddleson (47) zweifelten an der Alanintheorie Brauns, mußten aber bei Zugabe von 0,2 % DL-Alanin zu frischen Bouillonkulturen ebenfalls eine stärkere Dissoziation als bei den Kontrollversuchen feststellen. Sie arbeiteten diesen Versuch weiter aus, indem sie ihn unter Sauerstoffüberschuß durchführten. Bei dieser Versuchsanordnung ließ sich keinerlei Variantenbildung nachweisen. Reusse (42) konnte diese Ergebnisse anhand von eigenen Versuchen an Brucellen bestätigen. Seiner Ansicht nach besteht zwischen Alanin und Sauerstoff ein Antagonismus, bei dem die wachstumshemmende Wirkung des Alanins durch den wachstumsfördernden Sauerstoffgehalt aufgehoben und übertroffen wird. Reusse prüfte dies Ergebnis auch bei 8 weiteren Bakterienspecies und erhielt bei 5 von ihnen positives Ergebnis. Weiter isolierte er pathogene Keime (Brucellen, Salmonellen und Rotlaufbakterien) aus Organen, Sekreten und Exkreten infizierter Menschen und Tiere und erhielt mehr oder weniger dissoziierte Kulturen. Aus strömendem Blut gewonnene Bakterien ergaben dagegen ausschließlich Kolonien von S-Form-charakter. Er erklärte dieses Ergebnis mit der guten Sauerstoffversorgung des Blutes. Die für das Zustandekommen der Dissoziation vielfach verantwortlich gemachten Einflüsse, wie Populationsdruck, Verbrauch der Nährstoffe oder die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte, spielen nach Reusse gegenüber dem Einfluß des Sauerstoffes nur eine untergeordnete Rolle. Nach Braun (10) entsteht bei Zusatz von Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Desoxyribonuclease (DN-ase) in bestimmten Mengen zum Nährmedium ein DNS-DN-ase-Abbauprodukt, das für die R- und M-Zellen der Brucellen toxisch wirkt, ohne einen nachteiligen Einfluß auf die S-Keime auszuüben. Die gleiche Wirkung soll nach Braun auch Kinetin haben (Kinetin - ein Wachstums- und Zellteilungsfaktor für Pflanzen), was Reusse an eigenen Arbeiten jedoch nicht bestätigen konnte.

In eingehenden Versuchen stellte Bordet (8) 1941 fest, daß die Erhöhung von Ca^{++} , Ba^{++} und Sr^{++} zum Nährmedium, zu einem starken Anwachsen der R-Varianten eines coliformen Stammes, der bei 37°C stabil

war, führte. Nach Cole und Braun (13) sollen Mn^{++} und Mg^{++} ein ähnliches Ergebnis bei Brucellen bringen. Dies spricht wieder für die Ansicht, daß gehäuftes Auftreten von R-Formen u. a. durch das Anhäufen verschiedener chemischer Substanzen bedingt sein kann. Oft sollen geringste chemische Verschiebungen schon eine solche Folge haben.

Auch der Konsistenz des Nährmediums wird von einigen Autoren Bedeutung beigemessen. Schindler (48) beobachtete auf festen Nährböden selten eine Dissoziation und wenn, dann nur langsam; in Bouillon dagegen eine schnelle Variantenbildung. Ruesse (40), der dies ebenfalls bemerkte, nimmt an, daß die mutierten Bakterien im flüssigen Medium einen Wachstumsvorteil (positive Selektion) gegenüber den S-Zellen besitzen und sich deshalb schneller anreichern, bis schließlich die gesamte Kultur nur noch aus dissoziierten Bakterien besteht.

Der Einfluß von ultraviolettem Licht auf die Dissoziation wurde ebenfalls untersucht. Plouhgt (38) berichtet, daß bei S-Form-Kulturen der *Salm. typhi-murium*, die dem UV-Licht ausgesetzt waren, der Gehalt an R-Varianten von 2 % auf 100 % anstieg. Ein ähnliches Ergebnis beschreibt Rickert (44) in seiner Arbeit "Einfluß ultravioletter Strahlung auf den Stoffwechsel der untersuchten Bakterien". Er bestrahlte Bakterienaufschwemmungen 30 Minuten lang und überimpfte sie dann auf Platten. Die Kolonien wuchsen schneller als die glatten, halbkugeligen Kontrollen; waren flach, größer und hatten einen gezackten Rand. Beim Abnehmen erwiesen sie sich als trocken und bröckelig.

Die Frage, ob eine Rückdissoziation (Reversion) der R-Form in die S-Form möglich ist, wird seit Jahren diskutiert. Sie ist nicht allein vom genetischen Standpunkt interessant, sondern auch von großer praktischer Bedeutung (Virulenz, Immunität).

Während die Rückdissoziation bei Brucellen von Henry (22) und Huddleson (23) verneint wird, beschrieben Mailman und Gallo (33) eine *in vitro* und *in vivo* beobachtete Reversion von R- $\rightarrow$ S. Nach Züchtung von R-Formen in Bouillon, die R-Antiserum enthielt, konnten sie S-Formen isolieren. Meerschweinchen mit einem Gemisch von lebenden R-Formen und hitzegetöteten S-Zellen infiziert, brachten den gleichen Erfolg.

Lacy (Topley and Wilson's Principles) berichtet kurz über eine Serie von reversiblen Wechsel bei Kulturen des *Haemophilus influenza*, der durch Veränderung der Ionenspannung des Mediums und der Temperatur erlangt werden konnte.

Auch Reusse (29) beobachtete bei Brucellen in 5 von 70 untersuchten Fällen eine spontane Rückdissoziation.

3.) Folgen der Dissoziation

Von besonderer Bedeutung ist die Dissoziation von pathogenen Bakterien dann, wenn die Wandlung in der Kolonienmorphologie auch Veränderungen in der Virulenz nach sich ziehen. Die Zusammenhänge sind bei einer Reihe von Krankheitserregern bereits geklärt.

So weiß man von den Pneumokokken, daß ein $S \rightarrow R$ -Wechsel begleitet ist von dem Verlust der charakteristischen Kapsel mit den Kapselpolysacchariden, die die Virulenz und die Typenspezifität ausmachen. Griffith (18) spritzte Mäuse s.c. mit lebenden, avirulenten R-Formen, gemischt mit großen Mengen hitzegetöteter S-Pneumokokken derselben oder einer anderen Gruppe. Es entstanden S-virulente Pneumokokken.

Bei den Salmonellen führt der Verlust des O-Antigens, der beim Wechsel $S \rightarrow R$ stattfindet, ebenfalls zur Avirulenz der betreffenden Keime. Bei *C. diphtheriae* dagegen gleichen die Eigenschaften der Abspaltungsformen denen der Ursprungsformen (Caselitz).

Bei Brucellen ist nach Reusse (40) und Schindler (48) die Umwandlung der S- in die Nicht-S-Form ebenfalls mit einem Virulenzabfall gekoppelt.

B. DIE KULTURMORPHOLOGIE DER MYCOBAKTERIEN

1.) Die Kolonieform

Robert Koch (27) hat bereits 1884 die Entwicklung der Kolonien der Tuberkelbakterien auf festen Nährböden beobachtet und die Ergebnisse veröffentlicht. Anhand einer Zeichnung stellte Koch die charakteristische Zopfbildung der Kolonien dar, die Jahrzehnte später unter dem Begriff "Cordbildung" bekannt und näher untersucht wurde.

Die beobachteten Kolonieformen der Mycobakterien sind sehr mannigfaltig, weisen aber zweifellos auch Ähnlichkeit mit den Dissoziationsformen anderer Keimarten auf.

Wagner und Mitscherlich (53) beschreiben in der Arbeit "Zwei neue Nährböden zur kulturellen Differenzierung der Tuberkelbakterientypen" zwei ähnlich geartete Koloniebildungen; 1.) Die Keime sind, wenn überhaupt, so nur zu kurzen feinen Strängen vereint, so daß die Kolonie ein ornamentartiges Gepräge vermissen läßt; sie ist etwas erhaben und erscheint grobgranuliert - mitunter höckerig. Der Rand ist unregelmäßig begrenzt. 2.) Deutliche Schlingenbildung durch die strangförmige Anordnung der Keime. Die Schlingen können die Kolonien in ihrer ganzen Breite durchziehen und verleihen ihnen dadurch einen reliefartigen Charakter. Sie sind flach und mit unregelmäßigem Rand versehen. Zwischen diesen beiden Typen gibt es nach Ansicht der Verfasser mannigfache Übergänge.

Seiffert (51) sah bei Mycobakterien folgende Kolonievariationen:

1) R-Formen (apathogen)

- a.) Hohe Häufchenform: blumenkohlartig, aus groben, aufeinandergeschichteten Häufchen bestehend.
- b.) Gewundene Häufchenform: wie ein Knäuel Würmer drehen sich runde Stränge durcheinander. Junge Kolonien sehen ringförmig aus.
- c.) Flache Körnchenform: viele Körnchen flach nebeneinander gelagert, der Rand der Kolonie ist unregelmäßig gezackt. Dem

Zentrum kann ein grobes Häufchen aufsitzen, Kolonien können aber auch nahezu homogen erscheinen.

2) Indifferente Formen (teils pathogen, teils apathogen)

Hauchform: Kolonien breiten sich als ganz zarter Hauch, kaum sichtbar, mit unregelmäßigen Umrissen auf der Platte aus.

3) S-Formen (pathogen)

a) Feuchte S-Formen: Feuchte Strichform: Keime wachsen in einem gut verstreichbaren, feucht glänzenden Strich. Einzelkolonien sind weinblattähnlich gezackt.

Feuchte Halbkugelform: weiße, glänzende Halbkugeln, teils der Strichform aufsitzend, teils isoliert. Koloniedurchmesser ca. 5 mm.

b) Trockene S-Formen: Trockene Strichform: Die Keime wachsen in einem schlecht verstreichbaren, fest zusammengebackenen Strich. Die Einzelkolonie stellt sich als winzige, gelbliche Halbkugel dar. Ca. 1 mm Durchmesser.

Trockene Halbkugelform: Die Keime wachsen als harte, glatte, gelblich bis rötlich-braune Halbkugel von ungefähr 5 mm Durchmesser.

4) Riesenformen (teils pathogen, teils nicht)

Nur einmal beobachtet: trockene Halbkugeln und Scheiben.

In ihrer 1930 veröffentlichten Arbeit über die Dissoziation der Mikroorganismen beschrieben Petroff und Steenken (37) die Koloniebildung von *M. tuberculosis* Typus bovinus und *M. avium*.

Typus bovinus:

a) Völlig runde, mottenkugelnähnliche, opake Kolonien, Oberfläche glatt, gut verreibbar.

b) Größere Formen, stumpf opak, im Alter cremefarben, Oberfläche trocken und gefurcht, Zentrum erhaben. Schwer emulgierbar.

Meerschweinchen, infiziert mit der ersten Form, zeigten in kurzer Zeit hochgradige Tuberkulose und reagierten schon nach 12 - 15 Tagen auf Tuberkulin. Mit der zweiten Form infizierte Tiere reagierten auf Tuberkulin erst nach 4 Wochen und die tuberkulösen Veränderungen blieben lokalisiert.

M. avium: (ein alter Laborstamm)

- a) Flache, leicht opake Kolonien, Zentrum erhöht, Peripherie leicht durchscheinend und Oberfläche zerklüftet. Große Ähnlichkeit mit der rauen Form von Typus bovinus (Hauptanteil der Kolonieförmigkeiten).
- b) Mottenkugelförmig, feucht-glänzend, leicht zu emulgieren, bevorzugt auf alkalischem Nährboden wachsend. Diese Form zeigte nach 7monatiger Beobachtung plötzlich Knospen von wurmförmlicher Erscheinung, die sich auf der Platte ausbreiteten. Nach Ansicht der Verfasser ist die glatte Form = S-Form für Hühner pathogener als die R-Variante.

Fregnan und Smith (15) teilen die Mycobakterien anhand ihrer Koloniemorphologie in 13 Gruppen ein, von denen bei den pathogenen Tuberkelbakterien 6 Formen vorkommen können:

- a) Rough-Cs: (C = cord und s = serpentine) Diese Kolonieförmigkeit setzt sich aus serpentinienähnlichen Elementen zusammen. Parallel gelagerte Fäden und Zöpfe laufen in Schleifen und Windungen vom zentralen Hof zur Peripherie hin und bilden einen dünnen und unregelmäßig gewellten Rand. Die Farbe unter dem Mikroskop ist grau, makroskopisch dagegen cremig-weiß. Kolonien trocken und in Salzlösung schlecht verreibbar. Zu finden ist diese Form bei den meisten Mycobakterien, solange sie jung sind.
- b) Rough-R: Flache Kolonie von komplexer, baumförmlicher Struktur, deren Fäden und Locken an der Peripherie gut sichtbar sind und zum Zentrum hin konzentrierter werden. Die Oberfläche bietet das Bild von seichten Furchen und Falten. Der Rand ist unregelmäßig. Makroskopisch sieht diese Form cremig-weiß und trocken aus, mikroskopisch gesehen ist das Zentrum im Gegensatz zur grauen Peripherie schwarz. Ist schwer in Salzlösung zu zerreiben. Zu finden ist dieser Kolonietyp u. a. bei Säuger- und Geflügeltuberkelbakterien zwischen 21. und 30. Tag.
- c) Rough-A: Kolonie mit schwarzen Granula oder Fäden, die sich vom Zentrum zur Peripherie ziehen. Die Fäden sind so dicht gelagert, daß sich das Bild einer homogenen, aber welligen Oberfläche bietet. Die

makroskopische Farbe ist cremig weiß. Mikroskopisch gesehen erscheinen die Kolonien im Zentrum schwarz, sie werden nach der Peripherie hin stufenweise heller bis zu hellgrau. Diese Form ist - ebenso wie Rough-R - von trockenem Aussehen und schwer in physiologischer Kochsalzlösung zu verreiben. Vorkommen bei *M. avium* und nicht-chromogenen Stämmen zwischen 21. und 25. Tag.

- d) Smooth-S: Kolonien mit zentraler kuppelartiger Wölbung, die allmählich zur Peripherie hin abfällt. Der abgeflachte Rand ist unregelmäßig gewellt. Farbe makroskopisch: cremefarben, mikroskopisch: schwach gelb bis lohfarben-weiß. Kommt vor bei *M. avium* zwischen dem 21. und 25. Tag.
- e) Smooth-T: (T = transparent) Kolonie durchsichtig, flach, feucht glänzend mit kleinem zentralen Hof. Der Rand ist unregelmäßig gewellt und die Oberfläche gefältelt. Das makroskopische Bild ist farblos, mikroskopisch gesehen besitzt diese Kolonieform eine schwach gelbliche Farbe. Läßt sich leicht in Salzlösung suspendieren. Zu finden bei frisch isolierten Geflügeltuberkelbakterien-Stämmen und bei jungen Kulturen anderer Mycobakterienarten.
- f) Smooth-D: (D = dome, kuppelartig) Kolonien mit schwach konvexer, kuppelartiger Oberfläche und wellig-rundem Rand. Makroskopisch: chremig-weiß und mikroskopisch gesehen: lohfarben bis braun. Glatt, glänzend und leicht verreibbar. Zu finden bei *M. avium* und jungen Kulturen anderer Arten, besonders wenn diese eng zusammengelagert liegen.

Außer diesen Formen beschreiben die Verfasser noch: Rough-Ry, Rough-F, Smooth-Sy, Smooth-K, Smooth-Kw, Smooth-F, Smooth-Dy und Smooth-Iy. Diese Kolonien sind nur bei apathogenen Mycobakterien beobachtet worden.

So beobachtete Krause (29) bei einem Stamm "Steinhuhn" (*M. avium*) eine glatte und eine raue Kolonieform. Die glatten Kolonien wuchsen wachspferlenartig glänzend, hatten glatte Oberfläche und waren glattrandig, leicht mit der Öse vom Nährboden abzuheben und in Wasser zu zerreiben. Die rauhen Kolonien waren runzelig, besaßen ein erhöhtes Zentrum und eine flache, raue Ringterrasse. Sie ließen sich schwer abheben und schlecht verreiben. Krause infizierte mit der glatten Form 11 Hühner, die alle klinisch gesund blieben. Von 15 Tieren, die er mit der rauhen Form infi-

zierte, starben 6 und die übrigen 9 zeigten beim Schlachten tuberkulöse Veränderungen.

2.) Ursachen und Eigenschaften der Koloniefornen:

Die Variantenbildung der Mycobakterien erweist sich beeinflufbar durch Faktoren, die auch bei der Dissoziation anderer Keimarten eine Rolle spielen.

Nach Ansicht Bassermanns (5) bestehen intermediäre Kolonietypen nicht aus Bakterien, die beide Merkmalsgruppen in sich tragen, sondern erweisen sich in ihrem morphologischen Aufbau eindeutig als ein Nebeneinander von R- und S-Varianten, die in ihrem mikroskopischen Aufbau scharf gegeneinander getrennt sind und höchstens an den Kontaktstellen sich leicht durchwachsen. Den genetischen Kräften der Einzelzelle wird dabei eine größere, übergeordnete Bedeutung beigemessen. Trotzdem können Umwelteinflüsse das Gesamterscheinungsbild einer Kultur ändern. Diese Auffassung wird von vielen Autoren geteilt.

Fregnan, Smith und Randall (16) beobachteten bei den Mycobakterien, daß eine Form in die andere überwechseln kann durch Änderung des Nährbodens bzw. der Konzentration der einzelnen Bestandteile. Sie glauben, daß ein Wechsel der Kolonieform durch Umgebungswechsel vorläufig und viele "Varianten" eine Adaption an die neue Umgebung seien. Die "Varianten", auf das alte Medium gebracht, werden wieder zu "Normalformen".

Seiffert (51) stellt im Rahmen seiner Veröffentlichung "Untersuchungen über die Variabilität boviner Tuberkelbazillen" fest, daß zahlreiche Variationserscheinungen offenbar krankhaften Ursprungs seien. Er beobachtete, daß die Veränderungen meist gehäuft bei alten Stammkulturen auftreten; allerdings nur dann, wenn der Ursprungsstamm bereits eine Aufspaltung zeigte. Reine Stämme blieben auch nach monatelanger Aufbewahrung stabil. Diese, von ihm, wiederholt gemachten Beobachtungen, lassen Seiffert zu dem Schluß kommen, daß bei der bakteriellen Variantenbildung mit bestimmten Gesetzmäßigkeiten zu rechnen ist, ein Ergebnis, zu dem Baerthlein (4) auch schon kam.

Brauer (9) ist der Ansicht, daß bei dem S--> R-Wechsel der Mycobakterien es sich um eine plötzlich einsetzende Stoffwechselstörung handelt, die die gesunden S-Formen trifft und sich im Verlust der Fähigkeit äußert, das für sie spezifische und serologisch charakteristische Kohlehydrat zu bilden. Statt dessen produzieren die R-Formen einen völlig neuartigen, wasserunlöslichen Eiweißkörper (der den Wechsel der Keime von Hydrophilie zur Hydrophobie erklären könnte). Nach Brauer ist dieser Vorgang meistens mit Virulenzverlust verbunden. Durch Behebung der Stoffwechselstörung müßte in diesem Fall wieder die S-Form und mit ihr die Virulenz auftreten.

Das Alter der Kultur hat nach Ansicht von Szulga, Madra und Kowalczyk (54) keinen Einfluß auf die Form, doch seien bei älteren Stämmen Variantenbildungen häufiger zu finden. Anderer Meinung sind Fregnan und Smith (15), die in verschiedenen Wachstumsperioden unterschiedliche Formen beobachteten.

Stamatin (52) arbeitete mit einem Stamm, der jahrelang unverändert glatt war. Eines Tages beobachtete er ein plötzliches Rauwerden der Kolonien und das völlige Verschwinden der glatten Form auf Sautonnährboden. Durch Tierversuche gelang es ihm, eine glatte stabile S-Variante zurückzu erhalten. Ein anderer, frisch isolierter, bei 37 °C gehaltener, glatter Stamm wies 3 Monate nach der Gewinnung rauhe Kolonien auf, die - weiterüberimpft - ihre rauhe Form behielten.

Außer den morphologischen Eigenschaften der Varianten, wurden noch andere, für die einzelnen Formen typische Merkmale beobachtet.

So berichten Saenz und Costil (46), daß die R-Form nur bei 37 - 42 °C wachse, die S-Variante dagegen auch die Fähigkeit besitze, sich noch bei Temperaturen von 32 - 25 °C weiterzuentwickeln.

Kahn und Schwarzkopf (25) bemerkten eine Verschiedenheit in der elektrophoretischen Bewegung: die S-Form soll schneller sein als die R-Form.

Gaytanjiew (17) berichtet, daß die S-Variante Malachitgrünnährboden bereits nach 4 Tagen entfärbt, die R-Form dagegen erst bedeutend später.

Nach Birkhaug (6) besitzt der S-Typ die Fähigkeit, sich fakultativ anaerob zu entwickeln, die R-Variante kann sich jedoch nur unter aeroben Bedingungen weiterentwickeln.

Bassermann (5) spricht den beiden Formen eine unterschiedliche Antibioticaresistenz zu.

3.) Kolonieform und Virulenz:

Saenz und Costil (42) wiesen auf Virulenzunterschiede hin. Beim Vorliegen der S-Form folgt schneller Krankheitsverlauf septikämischer Art mit Leber- und Milzhyperplasie, aber Fehlen der für die Tuberkulose typischen Veränderungen. Die R-Form bedingt die milde, chronische Tuberkulose, mit ausgeprägten makroskopisch erkennbaren tuberkulösen Herden in den Organen. Stamatin (52) erhielt bei Tierversuchen nur Formen, die denen ähnelten, die er den Tieren eingespritzt hatte. Auch nach Gaytanjew (17) verändern die R- und S-Formen sich durch Passagen nicht.

Die Virulenz der Geflügeltuberkelbakterien ist - wie die vieler anderer Mikroorganismen - eine veränderliche Fähigkeit. Viele Stämme sollen ihre Virulenz für Hühner durch lange Züchtung auf künstlichen Nährböden verringern oder auch ganz einbüßen, was nach Ansicht einiger Autoren von einer Umwandlung der Kolonieform begleitet wird, andere z.B. Brauer (9) teilen diese Auffassung nicht.

Die Behauptung Seifferts (51), die R-Form sei avirulent, der sich auch Brauer (9) und Gayanjew (17) anschließen, wird von Krause (29) abgelehnt. In seinen Tierversuchen erwiesen sich die R-Varianten als virulenter. Stamatin (52) konnte keine Beziehung zwischen der Koloniemorphologie und der Virulenz bemerken.

Da der Tierversuch, um einen Stamm auf Virulenz zu prüfen, viel Zeit benötigt, hat man nach Möglichkeiten gesucht, diese Untersuchung in vitro durchführen zu können. Große Hoffnungen werden in den Neutralrottest gesetzt, der erstmals 1948 von Dubos und Middlebrook (14) beschrieben wurde. Nach Zusatz von Farbindikatoren (Neutralrot, Nilblau, Methyl-

biau) treten Farbänderungen auf, die über den Grad der Virulenz aussagen sollen. Nach Goldman und Goldman (19) ist die Reaktion jedoch in der Hauptsache vom Alter der Kolonie, der Beimpfungsart und dem Medium abhängig. Schöpp (49) fand, daß sich frisch isolierte Stämme intensiver rot färben als alte Laborstämme, Rindertuberkelbakterien intensiver als Geflügeltuberkelbakterien.

Kölbel (28) sieht im Vorhandensein oder Fehlen bestimmter, chemisch definierbarer Substanzen, die Ursachen für den positiven, bzw. negativen Ausfall des Testes. Es gelang ihm den Neutralrotvirulenzfaktor von den Bakterien zu trennen. Mit diesem Extrakt tränkte er einen negativ reagierenden Saprophyten, der daraufhin eine positive Reaktion zeigte. Nach Ansicht des Autors enthalten die saprophytischen Bakterien auch Stoffe, die den Farbumschlag verursachen können. Nur liegen diese Stoffe entweder maskiert oder in so geringer Menge vor, daß sie im Neutralrottest zu keiner wahrnehmbaren Färbung führen. Er streitet dem Farbttest die Fähigkeit ab, eine verbindliche Aussage über die Virulenz eines Mycobakterienstammes zu machen.

Als ein teilweises Virulenzkriterium für pathogene Tuberkelbakterien wird auch deren Fähigkeit, Zöpfe und Locken zu bilden, angesehen. Nach Dubos und Middlebrook (14) sondern die Zellflächen der Mycobakterien einen Stoff ab, der von Robert Koch als Kittsubstanz, von den Autoren als Cordfaktor angesprochen wird. Diese Substanz bewirkt, daß transversal geteilte Zellenpolen miteinander verklebt bleiben. Durch den Geschiebedruck kommt es dann (Bassermann (5)) zu den Strängen und Wellen.

Bloch (7) gelang es, oberflächlich liegende Wachsstoffe mittels Petroläther zu extrahieren, die seiner Meinung nach verantwortlich sind für das Aneinanderhaften der Keime. Die von diesem Wachsstoff befreiten Bakterien klebten nicht mehr aneinander und erwiesen sich im Tierversuch als weniger virulent als vorher, obwohl ihre Vermehrungsfähigkeit *in vitro* sich unbeeinflusst zeigte. Diese oberflächliche Schicht hydrophober Substanzen kann auch der Grund für die schwere Benetzbarkeit der Mycobakterien sein. Nach Goldman und Goldman (19) kann die Cordbildung schwerwiegend beeinflußt werden durch die Zahl der Keime, die Art des Nährmediums und die Entwicklungszeit. Nach Ansicht Stoll's (53) ist es der Cordfaktor, der sich im Neutralrottest anfärbt. Ein neutralrotnegativer Stamm, der auch keine Cordbildung aufweist, ist nach Krasnow, Wayne und Salkin (30) avirulent. Falle jedoch beides positiv aus, so liege ein virulenter Keim vor bzw. einer, der die Fähigkeit in sich trage, wieder virulent zu werden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL UND METHODIK

1.) MATERIAL

Die Untersuchungen wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt:

Av 1

Av 95/1 = Stämme aus dem Institut für Mikrobiologie

Av 623 und Infektionskrankheiten der Tiere, München

Av 56

Av C = Eigenisolierung aus einem Huhn mit Miliartuberkulose

2.) METHODIK

Die Kulturversuche wurden bei einer Temperatur von 38°C und erhöhter Luftfeuchte durchgeführt.

Als Grundsubstrate verwendete ich den festen Sautonnährboden (Rezept Hallmann (21) Seite 234) und das flüssige "Herrmannsubstrat 30" (Rezept Hallmann (21) Seite 234).

Um die Kolonieforn einwandfrei beurteilen zu können, war es notwendig, auf den festen Nährböden Einzelkolonien zu erhalten. Das wurde erreicht, indem von einer Keimsuspension ausgegangen wurde, die in 1 ml 1 mg Keime enthielt und von der nach 10^{-6} -facher Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 0,1 ml pro Platte ausgespatelt wurde. Nach 10 und 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und das Verhältnis der glatten zu den rauen Formen bestimmt.

Um beim Auszählen die Kolonietypen besser unterscheiden zu können, habe ich die Platten teilweise vor dem Betrachten mit einer Kristalviolettlösung (1:2000) übergossen und die überschüssige Flüssigkeit nach 15 Sekunden wieder abgegossen (Test nach White und Wilson). Dieses Verfahren wird bekanntlich bei den Brucellen angewandt und ergibt eine stahlblaue

Färbung der S-Formen und eine weinrote der R-Formen. Auch bei den von mir untersuchten Mycobakterien fand ich diese unterschiedliche Anfärbbarkeit verschiedener Kolonieförmigkeiten, die das Auszählen erheblich erleichterte. Ich habe die Kolonievarianten je nach ihrem Wachstum, in Anlehnung an die Dissoziationsformen anderer Bakterienarten, als R- und S-Formen bezeichnet, ohne sie diesen aber generell gleichsetzen zu wollen. Abweichungen von den typischen Formen wurden als Sr bzw. Rs bezeichnet.

Die Stammkulturen meiner Versuchsstämme wurden auf Löwenstein-Jensen-medium gehalten und für die einzelnen Versuche von diesen Kulturen Material entnommen. Sofern die Methodik der einzelnen Versuche nicht mit der oben beschriebenen übereinstimmt, wird sie in den entsprechenden Abschnitten gebracht.

B. VERSUCHSERGEBNISSE

1.) VORVERSUCHE

Um meine Arbeiten unter möglichst günstigen Wachstumsbedingungen durchführen zu können, habe ich mit den institutseigenen, schnellwachsenden, saprophytären Mycobakterien 198 S, K 4, Di 19 und B Di 2 Versuche hinsichtlich der Luftfeuchtigkeit, der günstigsten Verdünnung und Verdünnungslösung angestellt.

a.) Um ein Austrocknen der Platten und damit ein vorzeitiges Sistieren des Wachstums zu verhindern, erwies es sich als notwendig, im Brutschrank ein feuchtes Milieu zu schaffen. Dies wurde erreicht, indem mit Wasser gefüllte Petrischalen zwischen die Platten gestellt wurden und die Bebrütung in einem dicht verschließbaren Brutschrank (Vakuumbutschrank) erfolgte. Unter diesen Bedingungen konnten die Platten ohne Beeinträchtigung des Wachstums und der Agarbeschaffenheit bis zu 15 Tage bei 38°C bebrütet werden.

Auf Kontrollplatten in einem normalen Brutschrank trat ab dem 6. Tag nach der Beimpfung keine Fortentwicklung der Kolonien mehr auf, und der Nährboden wies infolge von Austrocknung Risse auf.

b.) Da es für die Auszählung und Differenzierung der Formen nötig war, Einzelkolonien zu erhalten, wurde in Vorversuchen die günstigste Keimverdünnung ermittelt. Von den verschiedenen Verdünnungen, 1:100, 1:10 000 und 1:1 000 000 - ausgehend von der Vergleichslösung Av 1mg/ml - erwies sich 1:1 000 000 als die günstigste. In dieser 10^{-6} -fachen Verdünnung ließen sich Einzelkolonien sehr gut unterscheiden und auszählen, während in den dichterem Suspensionen die Kolonien oft zu einem einheitlichen Keimrasen zusammenwuchsen. Die Zahl der einzelnen Kolonietypen wurde durch Auszählen bei Lupenvergrößerung bestimmt, wobei insgesamt mindestens 100 Kolonien kontrolliert wurden.

c.) Um eine möglichst homogene Aufschwemmung der einzelnen Keime zu erhalten, untersuchte ich die Möglichkeit der Benützung oberflächenaktiver Mittel. Solche Mittel, wie z.B. Tween machen nach den Untersuchungen von Dubos (14) die lipoidhaltige Bakterienoberfläche für wässrige Substrate benetzbar und ermöglichen dadurch disperses Wachstum. Versuche mit 0,025 %igem Tween 40 und Tween 80 als Verdünnungslösungen hatten zwar den gewünschten Erfolg, doch trat gegenüber der Kontrolllösung (physiologische NaCl-Lösung) eine deutliche Wachstumsverminderung ein. Keime, die in Tween 40 suspendiert waren, wuchsen so gut wie überhaupt nicht. Tween 80 erwies sich als günstiger, aber auch hier erhielt ich bedeutend schlechteres Wachstum als auf den Vergleichsplatten, deren Keime in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt waren. Von einem Zusatz dispersionsfördernder Substanzen wurde deshalb Abstand genommen und die Keimsuspension stets mit physiologischer NaCl-Lösung vorgenommen.

2.) HAUPTVERSUCH (Kulturelle Untersuchungen)

a.) EINFLUSS VERSCHIEDENER NÄHRBÖDEN AUF WACHSTUM UND KOLONIEFORM

Fregnan, Smith und Randall (16) beobachteten bei Mycobakterien, daß durch Änderung des Nährbodens ein Formenwechsel eintreten kann. Nach ihrer Ansicht sind die meisten Kolonievarianten eine Adaption an die neue Umgebung, wobei nach Verbringen auf das gewohnte Medium dann auch wieder die alte Form angenommen wird.

Ich benützte drei feste Nährböden (Sauton, Solaktinnährboden nach Wagner und Mitscherlich und Albimiagar), die alle Boviserin (2 %ig) als Serumkomponente enthielten. Diese 3 Nährböden wurden ausserdem mit und ohne Zusatz von Tween 80 hergestellt.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchung sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Wachstumsintensität und Variantenbildung auf verschiedenen Nährmedien.

Zeichenerklärung:

- S = glattwachsend R = rauhwachsend
 Sr = rauhwachsende Variante Rs = glatte Variante
- = kein Wachstum
 + = zartes, kaum sichtbares Wachstum
 ++ = Kolonien makroskopisch gut zu sehen
 +++ = sehr üppiges Wachstum

Nährboden

		+++	++	+++	+++	+++
Sauton	+Serum	S 20%	S 25%	S 30%	R 100%	R 93%
		Sr80%	Sr75%	Sr70%		Rs 7%
		+++	++	+++	+++	+++
	+Serum +Tween	S 100%	S 100%	S 100%	Rs100%	R 10% Rs90%
Solaktin		+	++	++	++	+++
	+Serum	S 20%	S 20%	S 18%	R 100%	R 100%
		Sr80%	Sr80%	Sr82%		
		-	++	+	++	++
Albimi- agar	+Serum +Tween	-	S 100%	S 100%	Rs100%	Rs100%
		-	+	-	++	++
			S 25% Sr75%		R 100%	R 100%
		-	++	-	++	++
	+Serum +Tween		S 100%		Rs100%	R 10% Rs90%

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß eine sehr unterschiedliche Keimvermehrung der einzelnen Stämme eintrat. Das beste Wachstum war bei allen Stämmen auf dem Sauton-Nährboden zu verzeichnen, wobei der Zusatz von Tween 80 sich nicht auswirkte. Auf dem Solaktinagar war die Keimvermehrung weniger intensiv und es wirkte sich in allem der Tween-Zusatz regelmäßig ausgesprochen hemmend aus. Am schlechtesten schnitt der Albimiagar ab, der allerdings gewöhnlich auch zur Züchtung von Mycobakterien nicht verwandt wird. Immerhin kam es aber doch auf diesem Nährboden noch zu einem sichtbaren Wachstum bei 3 der 5 geprüften aviären Stämme. Der Zusatz von Tween 80 hatte keine Auswirkungen. Da sich der Nähragar nach Sauton zur Züchtung der Keime am besten geeignet hatte, wurde für die weiteren Versuche stets dieser Nährboden benutzt.

Hinsichtlich der Kolonieform zeigt sich, daß die Bebrütung auf den verschiedenen Nährböden keine bemerkenswerten Verschiebungen in der Verteilung der Kolonietypen hervorrief. Eine Änderung der Häufigkeitsverteilung trat nur dann ein, wenn den Nährböden Tween 80 zugesetzt wurde. In diesen Fällen trat stets eine Verschiebung zu gunsten der glatt wachsenden Kolonieformen (S bzw. Rs) ein; näher untersucht wurde diese Erscheinung im Teil b.) der Untersuchungen (Tabelle 2). (s. Abb. 1-5)

b.) EINFLUSS VERSCHIEDENER NÄHRBODENBESTANDTEILE

Zusatz von Tween 80 zum Nährboden

In diesem Versuch wurde der Einfluß verschiedener Tween-Konzentrationen untersucht und zwar wurde Tween 0,025; 0,5; und 1,0 %ig dem Nährboden zugesetzt. Das beste Wachstum erhielt ich bei 0,025 %. Die beiden anderen Konzentrationen ergaben keine Unterschiede in der Kolonieform, aber je mehr Tween der Nährboden enthielt, desto schlechter war das Wachstum der Keime. Der Einfluß des Tween auf die Kolonieform zeigt sich sehr deutlich in der Tabelle 2. Der Tweenzusatz macht sich bei den Versuchsstämmen durch deren Tendenz glatt zu wachsen bemerkbar.

Glyceringehalt

Der Sauton-Nährboden wurde mit 2 %; 5 % und 9 % Glycerin hergestellt und ein doppelter Plattensatz jeweils mit verdünnten Keimsuspensionen aller aviären Stämme beimpft. Nach 10 und 14 Tagen wurden die Kolonien auf Wachstum und Form hin untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, daß eine Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit und Kolonieform durch den unterschiedlichen Glyceringehalt des Nährbodens nicht eingetreten war. Keimvermehrung und Koloniemorphologie zeigten keinerlei Abweichung. Auf eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse wurde deshalb auch verzichtet. Für die weiteren Untersuchungen wurde auf Grund dieses Ergebnisses stets ein Sauton-Nährboden mit 2 % Glycerinzusatz verwendet.

Art und Gehalt des Serums

Oberdorfer und Lebek (36) stellten eine Wachstumsförderung der Tuberkelbakterien durch den Zusatz von Serum fest. Sie sprechen dem Serum selbst aber eine nutritive Eigenschaft ab, sondern nehmen an, daß der positive Einfluß des Serums auf das Wachstum auf einem Schutzeffekt beruht, indem die verschiedenen toxischen Substanzen, die im Nährboden vorkommen können, durch die Albuminproteine des Serums gebunden werden. Sehr ungünstig auf das Keimwachstum wirken sich z.B. die freien Ölsäuren aus, die von Tween immer in geringer Menge abgespalten werden.

Um einen möglichen Einfluß der Serumart auf die Koloniemorphologie zu prüfen, wurde der Sauton-Nährboden mit 3 verschiedenen Serumarten (0,5 %ig) hergestellt und diese dann vergleichend untersucht. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2: Einfluß von Tween und verschiedenen Serumarten auf die Kolonieform.

Sauton-Nährboden	Av 1	Av 95/I	Av 623	Av 56	Av C
+ bovine Plasma - fraktion V	Sr100%	Sr100%	Sr100%	R 100%	R 100%
+ bovine Plasma - fraktion V	S 100%	S 100%	S 100%	Rs 100%	Rs 100%
+ Tween (0,025%)					
+ Boviserin	S 20% Sr80%	S 25% Sr75%	S 30% Sr70%	R 100%	R 93% Rs 7%
+ Boviserin	S 100%	S 100%	S 100%	Rs 100%	R 11%
+ Tween					Rs 89%
+ inaktiviertes Rinderserum	S 20% Sr80%	S 27% Sr 73%	S 30% Sr 70%	R 100%	R 90% Rs 10%
+ inaktiviertes Rinderserum	S 100%	S 100%	S 100%	Rs 100%	R 10%
+ Tween					Rs 90%

Die Tabelle 2 zeigt klar, daß der Zusatz von "bovine plasma fraction V" hinsichtlich der Variantenbildung ein anderes Ergebnis hervorbringt, als es mit inaktiviertem Rinderserum und dem Boviserin der Behringwerke der Fall ist.

Enthält das Nährmedium "bovine plasma fraction V", so finden sich auf den Platten bei allen aviären Stämmen - egal ob es sich um glatt- oder um rauhwachsende Stämme handelt - reliefartige rau erscheinende Ko-

lonien. Die rauhen Stämme Av 56 und Av C zeigten sie ausgesprochen deutlich (R-Form), die glatten Stämme Av 1, Av 95/I und Av 623 ließen mehr netzartige Strukturen (Sr-Form) erkennen. Wird diesem Nährboden aber auch noch Tween 80 zugesetzt, so zeigen sich ausnahmslos glatt erscheinende Varianten.

Sind Boviserin oder inaktiviertes Rinderserum der Serumbestandteil, so ist die Trennung durch Tween nicht mehr so krass. Außer dem rauhen Stamm Av 56, der sich auch hier genau so verhält wie oben beschrieben wurde, zeigen die Versuchsstämme auf ein und derselben Platte mehrere Kolonieförmigen. Enthält der Nährboden aber auch noch Tween, so finden sich nur glatte Varianten.

Eine Ausnahme machte der noch junge Laborstamm Av C, der auch hier aufgespalten wurde, aber doch überwiegend glatte (Rs) Formen zeigte. Interessant ist, daß der Stamm Av 56 mit Rinderserum oder Boviserin als Serumkomponente manchmal Übergangsformen aufwies, die bei den anderen Stämmen nicht beobachtet wurden. Sie bestanden darin, daß die rauhen Varianten die Zopfbildung vermissen ließen und der Rand und die Oberfläche der glattwachsenden Kolonien leicht gewellt war (siehe Abb. 6 und 7). Die Ursache dieser Erscheinung konnte nicht geklärt werden.

Zusatz alter, steriler Bouillonkulturen zum Nährboden.

Reusse (42) erreichte eine intensivere Dissoziation bei den Brucellen durch Hinzufügen steriler Filtrate alter Bouillonkulturen zu frischen Kulturen.

In dieser Versuchsreihe wurden 30 Tage alte Av 1- und Av 56-Bouillon-Kulturen autoklaviert, filtriert und das Filtrat dem Nährboden zugesetzt. Die Hälfte der Platten enthielt außerdem noch Tween. Die Ergebnisse dieses Versuches finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Einfluß steriler Bouillon-Kulturen der Mycobakterien auf die Kolonieform.

Nährboden mit ...	Av 1			Av 56		
	+ abge- tötete Av 1	+ abge- tötete Av 56	Kontrolle	+ abge- tötete Av 1	+ abge- tötete Av 56	Kontrolle
Sauton	S 75%	S 75%	S 20%	R 100%	R 100%	R 100%
+ Serum	Sr25%	Sr25%	Sr80%			
Sauton + Serum + Tween	S 100%	S 100%	S 100%	R 100%	R 100%	Rs100%

Wie die Tabelle 3 zeigt, scheint es egal zu sein, ob das Filtrat abgetöteter Av 1- oder Av 56-Keime dem Nährboden zugesetzt wurde, diese beiden Plattensätze brachten ausnahmslos die gleichen Kolonieformen hervor. Bei dem Vergleich mit den Kontrollen stellt es sich heraus, daß eine Beeinflussung der Kolonieform durch den Filtratzusatz stattfindet: der glattwachsende Stamm Av 1 wächst mit Filtratzusatz auf dem Nährboden ohne Tween hauptsächlich glatt (S) und nur ein geringer Prozentsatz der Kolonien erscheint rau (Sr). Der rauhe Stamm Av 56 verhält sich genau umgekehrt: auf den Platten, auch wenn sie Tween enthalten, findet sich keine einzige glatte Kolonie der Form Rs.

0,02 % Alaninzusatz.

Reusse (40) und Braun (10) stellten eine Förderung der Dissoziation durch Alanin bei den Brucellen fest. Bei den Versuchen mit Alanin ließ sich

bei den Mycobakterien kein Einfluß feststellen. Da die Ergebnisse der Alanin-haltigen Platten völlig übereinstimmten mit den Kontrollen, wurde die tabellarische Wiedergabe der Ergebnisse unterlassen.

c.) EINFLUSS VON UMWELTBEDINGUNGEN

Reusse (40) u.a. beschreibt den dissoziationshemmenden Einfluß von Sauerstoff. Um zu untersuchen, ob diese bei Brucellen beobachtete Hemmung auch auf die Mycobakterien zutrifft, wurden mit den Stämmen Av 1; Av 56 und Av C folgende Versuche unternommen, nach der von Reusse beschriebenen Methode:

Sauerstoffüberschuß

Methodik (Flachschicht-Kultur-Methode):

Ein 100 ml Erlenmeyer-Kolben wurde mit 18 ml "Herrmannsubstrat 30" gefüllt und mit Keimen beschickt. Dieser Kolben wurde mehrmals täglich geschüttelt, sodaß die Flüssigkeit mit möglichst viel Sauerstoff in Berührung kam. Nach 20 Tagen wurde mit dieser Bouillon ein Plattensatz - Sauton mit und ohne Tween - beimpft und 10 Tage später beurteilt und außerdem wurde ein Ziehl-Neelsen-Präparat angefertigt.

Tabelle 4: Einfluß von Sauerstoffüberangebot auf die Variantenbildung:

	Av 1	Av 56	Av C
Sauton	S 12 %	R 94 %	R 98 %
+			
Boviserin	Sr88%	Rs 6 %	Rs 2 %
Sauton			
+		R 9 %	R 12 %
Boviserin	S 100%		
+		Rs 91 %	Rs88 %
Tween			
Ziehl-Neelsen- Präparat	Viele Einzelzellen	Einzelzellen + Zellklumpen + Ketten bis zu 8 Bakterien	Einzelkeime + Zellklumpen + Ketten bis zu 8 Bakterien

Beim Betrachten von Tabelle 4 zeigt es sich, daß die Ergebnisse der beimpften Platten hinsichtlich der Koloniemorphologie nahezu mit den Normalergebnissen von Tabelle 2 übereinstimmen. Von Interesse ist jedoch das mikroskopische Präparat. Unter Sauerstoffüberangebot weist der glattwachsende Stamm Av 1 das gleiche Bild auf wie die Kontrolle: Einzelzellen, die ungeordnet durcheinanderliegen. Die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C dagegen lassen unter Sauerstoffüberschuß die Zopfbildung der Kontrollen, die unter den üblichen Versuchsbedingungen bebrütet wurden, vermissen. Im Präparat finden sich nur Einzelzellen, Zellklumpen und vereinzelt Ketten, die bis zu 8 Bakterien enthalten können.

Sauerstoffmangel

Bei Sauerstoffmangel kommt es nach Reusse (40) zu einer verstärkten Dissoziation bei den Brucellen. In Ergänzung zu den Untersuchungen über den Einfluß des Sauerstoffüberangebotes wurde deshalb auch die Wirkung von Sauerstoffmangel auf die Koloniemorphologie einiger aviärer Versuchsstämme untersucht.

Methodik (Hochschicht-Kultur-Methode): Für diesen Versuch wurde ein Reagenzglas mit 9 ml "Herrmannsubstrat 30" und Keimen beschickt und mit Parafinum liquidum überschichtet. Wie bei dem eben beschriebenen Versuch wurde ebenfalls nach 20 Tagen Bebrütung ein Ziehl-Neelsen-Präparat angefertigt und ein Plattensatz beimpft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Einfluß von Sauerstoffmangel auf die Variantenbildung.

	Av 1	Av 56	Av C
Sauton	S 7%		
+		R 100%	R 100%
Boviserin	Sr93%		
Sauton			
+		R 12%	R 36%
Boviserin	S 100%		
+		Rs88%	Rs64%
Tween			
Ziehl-Neelsen- Präparat	viele Einzelkeime + Zellklumpen	wurzelähnliche verzweigte Stränge	wurzelähnliche verzweigte Stränge

Daß Sauerstoff auch bei den Tuberkelbakterien einen Einfluß auf die Variantenbildung haben kann, zeigt klar ein Vergleich zwischen den beiden Tabellen 4 und 5. Der Stamm Av 1, der bei viel Sauerstoff nur Einzelzellen im Präparat aufweist, bildet bei Sauerstoffmangel auch Zellklumpen. Die beiden rauen Stämme Av 56 und Av C dagegen bilden bei Sauerstoffmangel wieder Zöpfe, bei Sauerstoffüberangebot dagegen fanden sich nur vereinzelt Ketten, die aus höchstens 8 Keimen bestanden.

3.) HAUPTVERSUCH (Cytochemische und tierexperimentelle Untersuchungen)

Aus der Literatur-übersicht ist hervorgegangen, daß die Frage, ob bei Mycobakterien Zusammenhänge zwischen Kolonieform und Virulenz bestehen, umstritten ist. Da meine Versuchsstämme zum Teil in glatter, zum Teil in rauher Form vorlagen, erschienen Untersuchungen zu dieser Frage sinnvoll. Benützt wurde dazu ein cytochemischer Virulenztest, der sog. Neutralrottest und der Tierversuch mit experimenteller Infektion von Hühnern.

a.) NEUTRALROTTEST

Methodik: Bei der Ausführung des Testes habe ich mich nach den Angaben von Schöpp (49) gerichtet. Als Reagenzien fanden Verwendung: 50 %iger Methylalkohol, Veronalpuffer nach Michaelis, wässrige, 0,01 %ige frisch hergestellte Neutralrotlösung.

Die in 50 %igem Methylalkohol 2mal gewaschenen Keime wurden in Veronalpuffer suspendiert und zu dieser Keimaufschwemmung dann einige Tropfen der Neutralrotlösung gegeben. Nach 30 Minuten wurde abgelesen und folgendermaßen beurteilt:

++++	purpurrot	= stark positive Reaktion
+++	rot	
++	rosa	= schwach positive Reaktion
+	blassrosa	
-	gelblich	= negative Reaktion

Die Ergebnisse mit verschieden alten Kulturen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Aus den Befunden ergab sich ein deutlicher Unterschied im Verhalten der Stämme. Die in der glatten Wuchsform vorliegenden Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623 gaben nur eine sehr schwache Reaktion, die zwei rauen Stämme Av 56 und Av C reagierten dagegen stark positiv. Es zeigte sich somit ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Wuchsform und Ausfall des Testes. Die verschieden lange Bebrütungsdauer der Stämme vor dem Test spielte für den Ausfall offensichtlich keine Rolle.

Wenn der Neutralrottest nun tatsächlich etwas über den Virulenzgrad eines Stammes aussagt, müßten die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C bedeutend virulenter sein als die glattwachsenden Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623. Darüber sollten die weiteren Untersuchungen Aufschluß geben.

Tabelle 7: Ergebnisse des Neutralrottests.

	Av 1	Av 95/I	Av 623	Av 56	Av C
8 Tage bebrütet	++	-	+	+++	++++
13 Tage bebrütet	+	+	+	++++	++++
20 Tage bebrütet	+	+	+	++++	++++

b.) VIRULENZPRÜFUNG AN HÜHNERN

Zu dem Tierversuch wurden die glattwachsenden Stämme Av 1 und Av 623 sowie die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C herangezogen. Kurz vor Versuchsbeginn habe ich die 4 Stämme noch einmal auf ihre Eigen-

schaften hin untersucht. Dabei zeigten Av 1 und Av 623 - wie schon immer beobachtet - glattes Wachstum, agglutinierten nicht in physiologischer NaCl und trübten die Bouillon. Av 56 und Av C wuchsen rauh, agglutinierten in physiologischer Kochsalzlösung und bildeten ein Oberflächenhäutchen und körnigen Satz in Bouillon, die selbst aber klar blieb.

Methodik: Pro Stamm wurden 3 Hühner im Alter von 10 Wochen und annähernd gleichem Körpergewicht intravenös infiziert. Die Keimmenge betrug für das erste Tier 0,01 mg/kg, für das 2. Tier 0,1 mg/kg und für das dritte Tier 1,0 mg/kg. Den Versuchshühnern wurde alle 14 Tage Blut entnommen, um es in der Frischblutagglutination auf Antikörperbildung zu untersuchen. Als Testantigen habe ich ein aus dem Versuchsstamm Av 1 hergestelltes Antigen verwendet. Alle noch lebenden Hühner wurden 9 Wochen nach der Infektion getötet und ebenso, wie die früher spontan gestorbenen Tiere, unmittelbar nach dem Tode zerlegt. Die Beurteilung der Virulenz der Erreger erfolgte unter Berücksichtigung der Lebensdauer der Tiere, dem klinischen Verlauf der Tuberkulose, dem Sektionsbefund und bakteriologischen Befunden. Bei den bakteriologischen Befunden wurde bewertet:

- 1.) Die Zahl der mikroskopisch in Quetschpräparaten von Lunge, Leber und Milz nachweisbaren Ziehl-Neelsen-positiven Stäbchen.
- 2.) Die Zahl der aus 10 mg und 1 mg Milz auf Löwenstein-Jensen-Medium gewachsenen Kolonien. Dazu wurde 1 g Milz abgewogen, mit 6 %iger H_2SO_4 20 Minuten vorbehandelt und dann von einer 10- und 100-fachen Verdünnung 0,1 ml auf die Nährbodenoberfläche aufgebracht.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der Tierversuche und der bakteriologischen sowie serologischen Kontrollen sind in den Tabellen 8 bis 11 zusammengestellt.

Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, daß die stärkste Agglutination bei den mit dem glatten Stamm Av 1 infizierten Hühnern auftrat. Die mit Av 623 infizierten Tiere reagierten mit Ausnahme des Tieres, welches die größte Keimdosis erhalten hatte, erheblich schwächer. Von den mit den rauhwachsenden Stämmen infizierten Hühnern, agglutinierten die Av C-Tiere dagegen mit einer Ausnahme gut positiv, die Av 56-Tiere dagegen fast kaum.

Tabelle 8: Ergebnisse laufender Blutuntersuchungen.

Infektion i. v.			Ausfall der Frischblutagglutination			
Stamm	Dosis mg/kg	Tag der Infektion	14. Tag	28. Tag	42. Tag	60. Tag
Av 1	0,01	-	$\frac{+}{-}$	+	+	++
	0,1	-	$\frac{+}{-}$	++	++	+++
	1,0	-	$\frac{+}{-}$	++	+++	gestorben
Av 623	0,01	-	-	+	+	$\frac{+}{-}$
	0,1	-	$\frac{+}{-}$	+	+	$\frac{+}{-}$
	1,0	-	-	++	+++	++
Av 56	0,01	-	-	+	+	gestorben
	0,1	-	-	+	gestorben	
	1,0	-	+	gestorben		
Av C	0,01	-	$\frac{+}{-}$	++	++	++
	0,1	-	$\frac{+}{-}$	++	+++	gestorben
	1,0	-	-	+	gestorben	

Tabelle 9:

Verlauf des Tierversuches und Sektionsbefunde.

38

Infektion	Verlauf der Infektion			Sektions- und Schlachtbefund
	Dosis mg/kg n. ... Tg.	gestorben n. ... Tg.	getötet n. ... Tg.	
	0,01	-	+	Ernährungszustand: ausgezeichnet Leber: einzelne, ca. linsengroße, derbe, gut abgesetzte, gelbliche Herde Milz: 6,032 g, einzelne bindegewebig abgegrenzte Herde Lunge: o. B.
Av 1	0,1	-	+	Ernährungszustand: ausgezeichnet Leber: geschwollen, 5 ca. linsengroße, derbe, gelbliche Herde Milz: 9,910 g, geschwollen, sonst o. B. Lunge: o. B.
	1,0	44	-	Ernährungszustand: mäßig Leber: stark vergrößert und speckig, hirsekorngroße Herde Milz: 30,976 g, enorm vergrößert und brüchig Lunge: einige Knötchen

0,01	-	+	-	Ernährungszustand: ausgezeichnet Leber: einzelne, linsengroße, speckige Herde Milz: 3,760 g, Veränderungen nicht feststellbar Lunge: o. B.
Av 623	0,1	-	+	Ernährungszustand: ausgezeichnet Leber: einige miliare und etwas größere speckige Herde Milz: 6,034 g, einzelne miliare Herde Lunge: o. B.
1,0	-	+	-	Ernährungszustand: gut Leber: enorm vergrößert, Miliartuberkulose Milz: 9,087 g, hypertrophisch und Miliartuberkulose Lunge: makroskopisch o. B.
0,01	62	-	10	Ernährungszustand: sehr schlecht Leber: stark hypertrophiert und speckig, Miliartuberkulose Milz: 12,98 g, stark geschwollen, genau wie die Leber Miliartuberkulose Lunge: o. B.
Av 56	0,1	-	2	Ernährungszustand: mager Leber: sehr stark geschwollen und speckig, Miliartuberkulose Milz: 14,760 g, sehr stark geschwollen und speckig, Miliartuberkulose Lunge: tuberkulöse Veränderungen

Tabelle 9: Fortsetzung

Infektion Verlauf der Infektion

Stamm Dosis gestorben getötet gekränkelt
mg/kg n. ... Tg. n. ... Tg. n. ... Tg.

Sektions- und Schlachtfund

1,0	28	-	4	Ernährungszustand: sehr mager Leber: sehr stark geschwollen, speckig, Miliartuberkulose Milz: 13,0967 g, sehr stark geschwollen, speckig, Miliartuberkulose Lunge: einige tuberkulöse Veränderungen
0,01	64	-	14	Ernährungszustand: hochgradig abgemagert Leber: stark verändert, geschwollen, brüchig, Miliartuberkulose Milz: 8,130 g, die gleichen Veränderungen wie die Leber Lunge: von vielen gelblichen bis hirsekorngroßen Punkten durchsetzt
Av C 0,1	44	-	8	Ernährungszustand: sehr mager Leber: stark vergrößert, speckig, Miliartuberkulose Milz: 11,764 g, stark vergrößert, speckig, Miliartbc. Lunge: viele hirsekorngroßen Knötchen
Ac C 1,0	33	-	5	Ernährungszustand: sehr schlecht Leber: stark geschwollen und speckig, Miliartuberkulose Milz: 6,808 g, stark geschwollen und speckig, Miliartuberkulose Lunge: von vielen hirsekorngroßen Knötchen durchsetzt

Tabelle 10: Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung von Organausstrichen,

(Ziehl-Neelsen-Färbung)

- = keine Tuberkelbakterien im Präparat zu finden
 + = einige Keime im ganzen Präparat
 ++ = einige Keime in jedem Blickfeld
 +++ = viele Keime in jedem Blickfeld

Infektion i. v. Nachweis säurefester Stäbchen in

Stamm	Dosis mg/kg	Leber	Milz	Lunge
Av 1	0,01	-	+	-
	0,1	+	++	-
	1,0	++	+++	++
Av 623	0,01	-	+	-
	0,1	++	+	-
	1,0	++	+++	-
Av 56	0,01	+++	+++	-
	0,1	+++	+++	-
	1,0	+++	+++	+
Av C	0,01	++	+++	+++
	0,1	++	+++	+++
	1,0	+++	+++	+++

Tabelle 11: Ergebnisse der kulturellen Isolierung aus Milzgewebe.

Infektion i. v.		Zahl der Kolonien in		
Stamm	Dosis mg/kg	10 mg Milz	1 mg Milz	Koloniemorphologie
Av 1	0,01	13	7	glatt
	0,1	17	8	glatt
	1,0	mehr als 50	9	glatt
Av 623	0,01	-	-	glatt
	0,1	2	1	glatt
	1,0	6	5	glatt
Av 56	0,01	geschlossener Rasen	lückenhafter Rasen	rauh
	0,1	geschlossener Rasen	lückenhafter Rasen	rauh
	1,0	geschlossener Rasen	lückenhafter Rasen	rauh
Av C	0,01	verunreinigt	verunreinigt	rauhes Rasen und
	0,1	5	-	vereinzelt glatte
	1,0	dünnere Rasen	mehr als 50	Kolonien

Die ersten eindeutig positiven Agglutinationen wurden nach ca. 4 Wochen beobachtet. Im allgemeinen verstärkte sich die Intensität der Reaktionen gegen Versuchsende bzw. kurz vor dem Tode. Eine Ausnahme bildeten die mit Av 56 infizierten Tiere und die mit geringen Keimdosen des Stammes Av 623 angesteckten Hühner.

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen Agglutinationsbereitschaft und Koloniemorphologie zeigte sich nicht. Einerseits lieferten nämlich 2 der mit dem glattwachsenden Stamm Av 623 infizierten Hühner praktisch keine Reaktion und andererseits traten nach Infektion mit dem rauhen Stamm Av C deutliche Agglutinationen auf. Dieses Verhalten, zusammen mit den gerade entgegengesetzten Ergebnissen bei den Stämmen Av 1 (glatt) und Av 56 (rauh), scheint dafür zu sprechen, daß antigene Unterschiede bei Geflügeltuberkelbakterien vorkommen, die nicht von der Kolonieform abhängig sind.

Ein gewisser Einfluß der Virulenz eines Stammes auf den Ausfall der Agglutinationen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, denn es sieht nach der Zusammenstellung in Tabelle 9 doch auch so aus, als würde ein ausgesprochen septikämischer und rascher Verlauf der Tuberkulose die humorale Antikörperbildung nahezu vollständig unterbinden.

Aus Tabelle 9 sind die Überlebensdauer der Tiere und die Sektionsbefunde zu ersehen. Nach der Infektion mit den glattwachsenden Stämmen Av 1 und Av 623 starb nur ein Tier vor Ablauf der Versuchsdauer und zwar das mit der höchsten Dosis (1,0 mg/kg) des Stammes Av 1 infizierte Huhn. Alle anderen Tiere mußten nach 9 Wochen getötet werden, wobei sie sich in gutem bis sehr gutem Ernährungszustand befanden. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen und auch die Milzgewichte variierten proportional der verabreichten Infektionsdosis. Die vielfach nur vereinzelt vorliegenden tuberkulösen Herde ließen nach Aussehen, Größe und Beschaffenheit auf eine relativ wirksam gewordene Abwehrreaktion des Körpers schließen. Typische Miliartuberkulose lag nur bei den Tieren vor, die mit einer sehr hohen Keimdosis (1,0 mg/kg) infiziert worden waren.

Die Infektion mit den rauhwachsenden Stämmen Av 56 und Av C führte bei allen Tieren vor Versuchsende unter deutlichen klinischen Symptomen zum Tode. Am raschesten starben die Tiere, denen 1,0 bzw. 0,1 mg Keime pro Körpergewicht verabreicht worden waren. Der Stamm Av 56 erwies sich dabei noch virulenter als der Stamm Av C. Bei der Sektion waren alle Tiere mehr oder weniger hochgradig abgemagert. Die Organe (Leber, Milz) zeigten starke Schwellungen und i. d. R. die typischen Veränderungen einer aus-

gebreiteten Miliartuberkulose. Die Hühnervirulenz der Stämme Av 56 und Av C war damit ganz eindeutig erheblich höher als die der Stämme Av 1 und Av 623.

Diese Tatsache wird auch bei der Betrachtung der Tabellen 10 und 11 klar bestätigt. Sowohl bei der mikroskopischen Untersuchung von Organausstrichen in der Ziehl-Neelsen-Färbung als auch bei der quantitativen Kontrolle der Keimzahl durch die Bestimmung der aus 10 und 1 mg Milz ermittelten Kolonien auf Löwenstein-Jensen-Medium zeigten die rauhwachsenden Stämme einheitlich die höheren Keimzahlen. Bei den mikroskopischen Befunden fiel auf, daß in den Organausstrichen die Geflügeltuberkelbakterien ausgesprochen kokkoid aussahen, während sie in den Kulturpräparaten gewöhnlich deutliche Stäbchenform besaßen.

Hinsichtlich der Koloniemorphologie zeigte sich, daß durch die Tierpassage kein Formenwechsel eintrat. Die glattwachsenden Stämme zeigten in den Kulturen, die aus den Organen der getöteten Hühner angelegt worden waren, wieder die gleiche Wuchsform. Und auch der rauhe Stamm Av 56 wuchs nach der Isolierung aus den Organen gestorbener Hühner wieder rauh.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

A. CHARAKTERISTIK DER VERSUCHSSTÄMME

Die von mir untersuchten 5 Stämme von *M. avium* lassen sich morphologisch und auf Grund ihres sonstigen Verhaltens in 2 Gruppen einordnen.

Die 1. Gruppe umfaßt die Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623. Diese Stämme entsprechen kulturmorphologisch (Lupenvergrößerung) und bezüglich ihrer übrigen Eigenschaften der bei anderen Bakterien als "glatt" (S) bezeichneten Dissoziationsformen (siehe Tabelle 12 und Abb. 1, 2 und 3). Zwei Arten von Kolonieförmungen wurden beobachtet:

- a.) S-Form: mittelgroße, feucht glänzende, kuppelartige, in der Regel runde Kolonien von grobgranuliertem Aussehen.
- b.) Sr-Form: nicht ganz glatt, sehr zart, durchscheinend, flach mit unregelmäßig begrenztem Rand. Vom meist verdichteten Zentrum aus ziehen sich netzförmig und wie ein Schleier Keimstränge zur Peripherie hin.
In der Mikrokultur bilden beide Kolonieförmungen regellose Keimhaufen. (s. Abb. 8)

Die 2. Gruppe umfaßt die Stämme Av 56 und Av C. Diese Stämme entsprechen kulturmorphologisch und bezüglich ihrer übrigen Eigenschaften den bei anderen Bakterien als "rauh" (R) bezeichneten Dissoziationsformen (siehe Tabelle 12 und Abb. 4 und 5). Auch hier konnte ich zwei Kolonietypen bemerken:

- a.) R-Form: Keimstränge, die sich in Schleifen und Windungen auf dem Nährboden ausbreiten. Inmitten dieser Zöpfe oft ein dicker, schwarzer Punkt. Zwischen den Windungen innerhalb der Kolonie keimfreie Stellen sichtbar. Begrenzung des Randes sehr unregelmäßig. Tiefe Ein- und Ausbuchtungen.
Neben dieser typischen R-Form konnte ich durch Boviserinzusatz statt "bovine plasma fraction V" auch Kolonien feststellen, die einzelne Zöpfe und Stränge nicht erkennen lassen, sondern kompakt sind, mit reliefartiger Oberfläche und unregelmäßig gewelltem Rand (Abb. 6).

- b.) Rs-Form: große, kreisrunde, halbkugelförmige, feingranulierte Kolonien, deren Zentrum oft eine grobgranulierte, warzenähnliche Sonderbildung aufsitzt. Auch hier konnte ich durch Änderung der Serumkomponente Boviserin statt "bovine plasma fraction V", eine leichte Veränderung in der Kolonieform bemerken: schwach gewellte Oberfläche und Rand. Eine Sonderbildung habe ich bei dieser Form nie gefunden (s. Abb. 7).

In der Mikrokultur bilden beide Kolonieformen vorwiegend parallelgelagerte Keimstränge in ketten- und zopfartigen Verbänden. (s. Abb. 9)

Tabelle 12: Charakteristik der Versuchsstämme.

	Av 1	Av 95/I	Av 623	Av 56	Av C
Wachstum auf Löwenstein-Jensen- Nährboden (makroskopisch)	S	S	S	R	R
Agglutination in physiol. NaCl-Lösung	(+)	+ feinflockig	-	+++ grobflockig	+++ grobflockig
Verhalten gegen- über Wasser	hydrophil	hydrophil	hydrophil	hydrophob	hydrophob
Verhalten in Bouillon	wird trüb Schleimzopf	bleibt fast klar Schleimzopf	wird trüb, Schleimzopf	bleibt klar, dickes Ober- flächenhaut- chen, dicker körniger Satz	bleibt klar, dickes Ober- flächenhäutchen, dicker körniger Satz
Cordbildung	-	-	-	+++	+++
Malachitgrün wird entfärbt in ... Tagen	2	3	3	12	8

B. VARIANTENBILDUNG ODER DISSOZIATION ?

Hadley (20) definierte als Dissoziation oder Phasenwechsel das Auftreten von Kolonien in Bakterienreinkulturen, die sich in mehreren Merkmalen von der Ausgangskultur unterscheiden. Im Rahmen meiner Untersuchungen habe ich die Koloniemorphologie und weitere Eigenschaften von 5 *Mycobacterium avium*-Stämmen beobachtet, um zu sehen, ob Beziehungen zu den Dissoziationsformen anderer Keimarten bestehen. 3 meiner Stämme lagen in einer Form vor, die Ähnlichkeit mit der S-Form anderer Bakterien hatte. Die beiden anderen Stämme stimmten in ihrem morphologischen und übrigen Verhalten mit dem der R-Form anderer Bakterien überein. Es war nun zu klären, ob sich diese Formen konstant im Sinne der Hadley'schen Forderung verhielten.

Meine Untersuchungen hatten das Ergebnis, daß zwar durch Änderung der Wachstumsbedingungen Änderungen der Kolonieform zu erreichen waren, aber diese Änderungen erwiesen sich als reversibel. Den größten Einfluß auf die Variantenbildung hatte der Zusatz von Tween 80 zum Nährboden. Wurde Tween 80 dem Nährboden zugesetzt, so zeigten die Kolonien bei allen Stämmen ausschließlich, oder wenigstens zu einem hohen Prozentsatz, glatte Formen. Ich habe sie bei den Stämmen Av 1; Av 95/1 und Av 623 als S-Form, bei den Stämmen Av 56 und Av C als Rs-Form bezeichnet. Es ist bekannt, daß die Tuberkelbakterien und besonders das *M. avium* zum Wachsen Ölsäure benötigen. Meine Ergebnisse sprachen damit für die von Brauer (9) geäußerte Ansicht, daß es sich bei der Bildung von rauen Varianten um eine Stoffwechselstörung handelt, denn ohne Tween zeigten alle Stämme auf Sauton-Nährboden mehr oder weniger rauhe Formen.

Wurde dem Nährboden außer Tween auch das sterile Filtrat alter Bouillon-Kulturen von *Mycobacterium avium* zugesetzt, so zeigten die Stämme wieder deutlich ihre charakteristische Wuchsform. Die Stämme Av 1; Av 95/1 und Av 623 behielten die typische glatte Kolonieform bei, die Stämme Av 56 und Av C bildeten trotz des Tween-Zusatzes Kolonien von rauhem Typ.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Befunden von Reusse (40), der bei Brucellen durch Zusatz von sterilen Filtraten alter Bouillon-Kulturen eine verstärkte Dissoziation auslösen konnte. Nach Reusse (43) und

Braun (10) besteht die dissoziationsfördernde Komponente der Filtrate in Alanin, das von den Brucellen gebildet wird. Das bewiesen Versuche, in denen durch alleinigen Alaninzusatz die gleiche Wirkung erzielt wurde wie durch Zugabe des Filtrates. In meinen Versuchen mit *Mycobacterium avium* bewirkte der Zusatz von 0,02 % Alanin zum Nährboden aber keine Veränderung des Wachstums oder der Kolonieform. Daraus muß geschlossen werden, daß die durch das Mycobakterienfiltrat hervorgerufene Wirkung auf die Koloniemorphologie nicht auf Alanin, sondern auf einer anderen Komponente des Filtrates beruhte.

Bei den Brucellen besitzt nach Reusse (43) Sauerstoff eine dem Alanin übergeordnete und entgegengesetzte Wirkung. Es gelang ihm durch Sauerstoffüberschuß, die Dissoziation völlig zu unterbinden und sie durch Sauerstoffmangel zu fördern. Ähnliche Versuche mit meinen *M. avium*-Stämmen ließen zwar eine leichte Beeinflussung der koloniemorphologischen Variantenbildung und der Cordbildung in flüssigen Kulturen erkennen, sie war jedoch bei weitem nicht so eindeutig wie bei den Brucellen. Bei Sauerstoffüberangebot trat eine leichte Verschiebung zu Gunsten der S-Formen und bei Mangel an Sauerstoff zu Gunsten der rauhwachsenden Typen auf. Bei den rauhwachsenden Stämmen kam es in der Flachschrift-Kultur-Methode unter Sauerstoffüberschuß zu einer Beeinträchtigung der Cordbildung, die in sauerstoffarmem Milieu dagegen deutlich ausgeprägt war. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß beim Zustandekommen dieses Ergebnisses das häufige Schütteln bei der Flachschrift-Kultur-Methode eine gewisse Rolle gespielt hat.

Auf Grund meiner Untersuchungen glaube ich mich deshalb zu der Annahme berechtigt, daß es sich bei den unterschiedlichen Wuchsformen innerhalb eines Stammes nur um eine Variantenbildung und nicht um Dissoziationsformen im Sinne Hadleys handeln kann. Das wird auch durch die Tatsache bestätigt, daß die durch Umweltfaktoren zustande gekommenen Kolonievarianten der beiden Grundtypen (Sr und Rs-Form) sich stets typisch verhielten. Es agglutinierten in der Spontanagglutination mit physiologischer NaCl-Lösung die R- und Rs-Formen der beiden rauen Stämme Av 56 und Av C spontan, während bei den S- und Sr-Formen der glatten Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623 keine Spontanagglutination auftrat.

Außer Zweifel steht aber meines Erachtens, daß bei den untersuchten Stämmen von Geflügelbakterien die 2 charakteristischen kulturmorphologischen Grundtypen, nämlich die glatte S- und die rauhe R-Form vorlagen. Sie zeigten auch in einer Reihe weiterer Eigenschaften durchaus Übereinstimmung

mit dem Verhalten der Dissoziationsformen anderer Bakterienarten. So agglutinierten die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C in physiologischer Kochsalzlösung und verhielten sich ausgesprochen hydrophob. Die glattwachsenden Stämme agglutinierten nicht spontan und ließen sich auf Grund ihres hydrophilen Verhaltens leicht verreiben. In Bouillon, die nicht getrübt wurde, bildeten die rauen Stämme ein Oberflächenhäutchen, das im Ziehl-Neelsen-Präparat betrachtet, aus vielen Zöpfen und Strängen bestand sowie einen körnigen großen Bodensatz. Die glatten Stämme dagegen trübten die Bouillon einheitlich und der Satz ließ sich zu einem mehr oder weniger dicken Schleimzopf aufschütteln.

Eigenartigerweise konnte allerdings trotz monatelanger Betrachtung der einzelnen Stämme ein Phasenwechsel im Sinne der bei anderen Keimarten bekannten Dissoziation und dem Befund von Krause (29) bei *M. avium* nicht nachgewiesen werden. Die vorliegenden Kolonietypen der Geflügel-tuberkelbakterien verhielten sich somit äußerst stabil und wenig beeinflusbar. Das schließt allerdings nicht aus, daß die rauhwachsenden Stämme nicht irgendwann einmal durch Dissoziation aus glattwachsenden aviären Stämmen entstanden sind.

C. KOLONIEMORPHOLOGIE UND VIRULENZ

Die Virulenz wird von vielen Autoren in Beziehung gesetzt zu der Koloniemorphologie. Bei anderen Bakterienarten z. B. Pneumokokken (12) und Salmonellen (26) ist es sicher, daß der S---R-Wechsel mit dem Verlust der Virulenz verbunden ist.

Reusse (40) und Schindler (48) nehmen es für die Brucellen auch an. Seiffert (51), der über die Variantenbildung boviner Mycobakterien arbeitete, will ebenfalls festgestellt haben, daß die rauen im Gegensatz zu den glatten Typen avirulent sind. Dem steht die Meinung von E. Krause (29) gegenüber, der bei den R-Varianten eines Stammes von *M. avium* die größere Virulenz beobachtete. Meine Befunde bestätigen im wesentlichen die Ansicht von Krause (29), denn unter meinen 4 Ver-

suchsstämmen erwiesen sich die 2 rauhen Stämme als bedeutend virulenter als wie die 2 glatten Stämme. So starben alle Tiere, die mit einem der beiden rauhen Stämme Av 56 und Av C infiziert worden waren, innerhalb der 9 wöchigen Versuchszeit spontan an Tuberkulose. Von den Hühnern, denen einer der beiden glatten Stämme Av 1 oder Av 623 i. v. verabreicht worden waren, starb nur ein Tier spontan und zwar das, welches die höchste Keimdosierung des Stammes Av 1 erhalten hatte. Die übrigen 5 Tiere mußten bei gutem Ernährungszustand getötet werden nach 9 Wochen. Der Schlachtfund der getöteten Tiere ergab vereinzelte tuberkulöse Herde in Leber und Milz, die aber schon im Ausheilen begriffen waren. Der Zerlegungsbefund der gestorbenen Tiere dagegen erbrachte ausnahmslos hochgradige Abmagerung und stark ausgebreitete Miliartuberkulose mit Schwellung von Milz und Leber. Übereinstimmende Ergebnisse mit den Zerlegungsbefunden brachte die in Ziehl-Neelsen-Präparaten von Leber- und Milz gefundenen Keimzahlen. Die größte Keimzahl enthielten die Organe der Tiere, die mit einem der beiden rauhen Stämme infiziert worden waren und die geringste die Tiere, die einen glatten *M. avium*-Stamm injiziert bekommen hatten und getötet werden mußten. Auch die kulturellen Untersuchungen über den Keimgehalt der Milz bestätigten die übrigen Befunde und zeigten eindeutig, daß die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C für die Versuchshühner virulenter waren als die eine glatte Kolonieförmigkeit aufweisenden Stämme.

Die Ergebnisse des Neutralrottestes stimmten mit den tierversuchsmethodischen Virulenzprüfungen vollkommen überein. Die rauhen Stämme Av 56 und Av C reagierten stark positiv und die glatten Stämme Av 1 und Av 623 nur schwach positiv. Übereinstimmung bestand außerdem noch hinsichtlich der Cordbildung. Nach Krasnow, Wayne und Salkin (30) ist ein Stamm, der im Neutralrottest positiv reagiert und auch Cordbildung aufweist, virulent, avirulent aber, wenn beides negativ ausfällt. Dies trifft auch für meine 4 Versuchsstämme zu, denn eine Cordbildung konnte ich nur bei den neutralrottestpositiven und sehr virulenten Stämmen feststellen.

Für die Diagnose der Geflügeltuberkulose wichtig erschien die Klärung der Frage, ob im Ausfall der Frischblut-Schnellagglutination eine Beziehung zur Koloniemorphologie der Infektionsstämme bestand. Von den Brucellen ist z. B. bekannt, daß die wenig virulenten R-Formen keine nachweisbare Bildung von agglutinierenden Antikörpern auslösen und serologisch deshalb in der Blutserumlangsamagglutination keine positiven Titer auftreten. In meinen Versuchen mit Geflügeltuberkelbakterien konnte ein gleichsinniges Verhalten nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Zwar traten die stärksten

Reaktionen bei den Tieren auf, die mit einem glatten Stamm (Av 1) infiziert worden waren. Aber hierbei handelte es sich um den Nachweis homologer Antikörper, denn das zur Agglutination verwandte Antigen war ebenfalls aus dem Stamm Av 1 hergestellt. Außerdem war die Agglutinationsbereitschaft der Hühner, die mit dem anderen glatten Stamm (Av 623) infiziert wurden, wesentlich geringer. Sie lag sogar noch unter der Agglutinationsfähigkeit der mit dem rauhen Stamm Av C getesteten Tiere. Die weitaus geringste Bildung von agglutinierenden Antikörpern wurde allerdings nach der Infektion mit dem rauhen Stamm Av 56 beobachtet. Ob diese Erscheinung aber allein auf Antigenunterschiede infolge der verschiedenen Kolonieform, die zwischen Infektionsstamm (Av 56) und dem zur Antigenherstellung verwandten Stamm Av 1 bestand, zurückgeht, muß dahingestellt bleiben. Es kann ebenso gut auch der rasche Ablauf der Infektion und der frühe Tod der Tiere, also die unterschiedliche Virulenz, dafür verantwortlich gewesen sein. Zur Klärung dieser Frage müßten noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) In vorliegender Arbeit wurden 5 Stämme von *Mycobacterium avium* auf ihre Koloniemorphologie, Variantenbildung und Virulenz hin untersucht. Drei der Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623 zeigten glattes, die beiden anderen Stämme Av 56 und Av C rauhes Koloniewachstum. Die glattwachsenden Stämme agglutinierten nicht in physiologischer NaCl, waren hydrophil und wiesen keine Cordbildung auf. Die beiden rauhwachsenden Stämme dagegen agglutinierten spontan in physiologischer Kochsalzlösung, zeigten sich ausgesprochen hydrophob und bildeten in flüssigen Kulturen ausgeprägte Zöpfe.
- 2.) Nach Zusatz von Tween 80 (0,025 %) zu einem festen Nährboden bildeten die rauhen Stämme glattaussiehende Kolonien (Rs-Varianten). Nach Subkultivierung auf gewöhnlichen Nährböden zeigten die Stämme aber wieder typisch rauhes Wachstum (R-Form). Bei den glattwachsenden Stämmen bewirkte der Tweenzusatz eine Verstärkung der glatten Wuchsform.
- 3.) Unterschiedlicher Glyceringehalt und Zugabe von verschiedenen Serumarten beeinflusste das koloniemorphologische Aussehen der Stämme bzw. die Variantenbildung nicht oder nicht wesentlich.
- 4.) Sauerstoffüberangebot führte bei den glattwachsenden Stämmen zu einer Verstärkung der typischen Kolonieform. Bei den rauhwachsenden Stämmen kam es auf festen Nährböden zu einer vermehrten Bildung von Varianten und in flüssigem Medium zu einer Hemmung der Cordbildung.

Sauerstoffmangel dagegen führte bei den glattwachsenden Stämmen zu einer vermehrten Variantenbildung und bei den rauhwachsenden Stämmen zu typisch rauhen Kolonien und starker Cordbildung.
- 5.) Im Neutralrottest reagierten die rauhwachsenden Stämme Av 56 und Av C stark positiv, die drei glatten Stämme Av 1; Av 95/I und Av 623 nur schwach positiv.

- 6.) Im Tierversuch mit abgestuften Keimmengen (0,01 - 0,1 - 1,0 mg/kg Körpergewicht i.v.) waren die rauhwachsenden Stämme für Hühner virulenter als die glatten Stämme. Alle 6 mit den rauhen Stämmen Av 56 und Av C infizierten Hühner starben während der 9 wöchigen Versuchszeit an Miliartuberkulose. Von 6 Hühnern, die mit den glatten Stämmen Av 1 und Av 623 infiziert worden waren, starb nur 1 Tier (Infektionsdosis 1,0 mg/kg) innerhalb 9 Wochen. Bei der Schlachtung der überlebenden Hühner wurden nur geringgradige und in Ausheilung begriffene tuberkulöse Veränderungen festgestellt.

Keimzählung in den Organen der Versuchshühner bestätigen die Virulenzunterschiede der glatten und rauhen Stämme,

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) ARKWRIGHT, J.A.: Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by spezific sera-
Pathol. and Bacteriol. 23, 358 (1919/20)

- 2.) ASSELINEAU, J.,
BLOCH, H. and
LEDERER, L.: A toxoid lipid component of the tubercle
bacillus ("cord-factor").
Am. Rev. Tub. 67, 853 (1953)

- 3.) AUHAGEN, H.: Bedeutung und Gewinnung von Einzell-
Kulturen bei Mycobacterium tuberculosis.
Zbl. Bakt. I. Orig. 179, 192 (1960)

- 4.) BAERTHLEIN, K.: Über Mutationserscheinungen bei Bakte-
rien.
Arb. Kaiserl. Ges. -Amt 40, 433 (1912)

- 5.) BASSERMANN, Fr.J.: Die mikromorphologischen Organisations-
prinzipien gerichtet wachsender Mycobak-
terien.
Beitr. zur Klinik der Tbk. 109, 345 (1953)

- 6.) BIRKHAUG, K.E.: Étude comparative des colonies dissociées
des cultures de bicelles tuberculeux aviaire,
bovin, et humain.
Compt. rend. Soc. de biol. 113, 726 (1933)

- 7.) BLOCH, H.: Journ. Exp. Med. 90, 197 (1950)

- 8.) BORDET, J.: Schweizer Z. Path. Bakt. 4, 321 (1941)

- 9.) BRAUER, L.: Untersuchungen über die Variabilität der Tuberkelbazillen.
Beitr. zur Klinik der Tbk. 81, 249 (1932)
- 10.) BRAUN, W.: Zitiert nach REUSSE (39)
- 11.) BRODHAGE, H.: Erstisolierung von Tb-Bazillen aus pathologischem Material auf festem Dubos-Nährboden.
Z. Hyg. 132, 105 (1951)
- 12.) CASELITZ, F. -H.: Beitrag zum S-R-Problem des Corynebact. - diphtheriae.
Z. Hyg. 130, (1949)
- 13.) COLE, L.J. and BRAUN, W.: J. Bact. 60, 283 (1950)
- 14.) DUBOS, R.J. and MIDDLEBROOK, G.: Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli.
Am. Rev. Tbc. 58, 698 (1948)
- 15.) FREGNAN, G.B. and SMITH, D.W.: Description of various colony forms of mycobacteria.
J. Bact. 83, 819 (1961)
- 16.) FREGNAN, G.B., SMITH, D.W. and RANDALL, H.M.: Biological and chemical studies on mycobacteria.
J. Bact. 82, 517 (1961)
- 17.) GAYTANJIEW, G.: Contribution to the Studies of R- and S-mycobacterium avium variants.
Ref., Landwirtschaftl. Zbl. IV Vet. Med. 8, 1713 (1962)

- 18.) GRIFFITH, F.: J. Hyg. (Camb.) 27, 113 (1928)
- 19.) GOLDMAN, E. and GOLDMAN, D. S.: Cording and neutral red reaction of two avirulent strains of mycobacterium.
Am. Rev. Tub. 73, 74 (1956)
- 20.) HADLEY, P.: J. inf. Dis. 40, 1 (1927)
- 21.) HALLMANN, L.: Bakteriologische Nährböden.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1953
- 22.) HENRY, B. S.: J. inf. Dis. 52, 399 (1933)
- 23.) HUDDLESON, I. F.: Studies in Brucellosis III.
Mich. State Coll. 1952
- 24.) Humphries, J. C.: Yale J. Biol. Med. 16, 639 (1944)
- 25.) KAHN, M. C. and SCHWARZKOPF, H.: Some biophysical properties of the tubercle bacillus.
Am. Rev. Tub. 23, 45 (1931)
- 26.) KAUFFMANN, F. A.: Die Bakteriologie der Salmonella-Spezies.
Verlag Munksgaard-Kopenhagen (1961)
S. 227
- 27.) KOCH, R.: Mitt. Kais. Ges. -Amt Berlin 1884
- 28.) KÖLBEL, H.: Zum Wert und Reaktionsmechanismus des Neutralrot-Testes.
Z. Hyg. 143, 387 (1957)

- 29.) KRAUSE, E.: Die Einzell-Kultur des Mycobacterium tuberculosis - glatte und rauhe Varianten -
Zbl.Bakt.I. Orig. 171, 497 (1958)
- 30.) KRASNOW, I., WAYNE, L.G. and SALKIN, D.: A microcolonial test for the recognition of virulent mycobacteria.
Am.Rev.Tub. 71, 361 (1955)
- 31.) KRUIF, de, P.: J.exp.Med. 33, 773 (1921)
- 32.) LÜDERITZ, O., KAUFFMANN, F., STIERLIN, H. and WESTPHAL, O.: Zur Immunchemie der O.Antigene der Enterobacteriaceae.
Zbl.Bakt.I. Orig. 179, 180 (1960)
- 33.) MALLMAN, GALLO: Zitiert nach REUSSE (39)
- 34.) MARIOTTI, A.: Der cytochemische Test bei der Virulenzbestimmung des Mycobacterium tuberculosis.
Ref.Zbl.Tbk.Forsch. 72, 320 (1956)
- 35.) MEYN, A., SCHMID, D.O. und SCHRINNER, E.J.: Zur Frage der Erfassung und Charakterisierung der Dissoziationsformen von Brucella abortus.
Zbl.Vet.Med. 4, 933 (1957)
- 36.) OBERDORFER, A. und LEBEK, G.: Untersuchungen über im Rinderserum vorhandene Nährstoffe für frischgezüchtete bovine Tuberkelbakterien.
Z.f.Naturforsch. 16, 304 (1961)

- 37.) PETROFF, S.A. and STEENKEN, W.: Biological studies of the tubercle bacillus. I. Instability of the organism microbic dissociation.
J.Exp.Med. 51, 831 (1930)
- 38.) PLOUGHT, H.H.: J.cell.comp.Physiol. 35, 141 (1950)
- 39.) REUSSE, U.: Zur spontanen und induzierten Rückdissoziation bei Brucellen.
Zbl.Vet.Med. 5, 329 (1958)
- 40.) REUSSE, U.: Das Verhalten von Brucellen und verschiedenen anderen Bakterienarten in sauerstoffreichen bzw. -armen Bouillon-Kulturen.
Z.Hyg. 148, 115 (1961)
- 41.) REUSSE, U.: Über die dissoziationsverhindernde Wirkung von Erythrozyten in Blutkulturen.
Z.Hyg. 148, 123 (1961)
- 42.) REUSSE, U.: Der Einfluß von Sauerstoff auf die Selektion von S-Zellen aus dissoziierten Kulturen.
Z.Hyg. 148, 127 (1961)
- 43.) REUSSE, U.: Untersuchungen zur dissoziationsinduzierenden Wirkung des Alanins bei Brucellen.
Z.Hyg. 148, 131 (1961)
- 44.) RICKERT, G.: Über den Einfluß ultravioletter Strahlung auf Wachstum und Stoffwechsel apathogener Mycobakterien.
Vet.med.Diss., Kiel 1940

- 45.) SAENZ, A. et COSTIL, L.: Propriétés biologiques et nombre des variétés dissociées en particulier des cultures de bacilles tuberculeux d'origine aviaire.
Compt. rend. Soc. de biol. 117, 852 (1934)
- 46.) SAENZ, A. et COSTIL, L.: Recherches sur les variations biologiques et la dissociation du bacille tuberculeux aviaire.
Ann. 1^{re} Inst. Pasteur 55, 518 (1935)
- 47.) SANDERS, E. and HUDDLESON, I.F.: The influence of environmental conditions on the growth and dissociation of *Brucella abortus*.
J. Vet. Res. 17, 324 (1956)
- 48.) SCHINDLER, R.: Untersuchungen über die Bedeutung der bakteriellen Dissoziation für den Wert des Lebendimpfstoffes gegen Brucellose des Rindes.
Behringwerke Mitteilungen, Heft 26
- 49.) SCHÖPP, J.: Vergleichende Untersuchungen über die Neutralrotreaktion nach DUBOS und MIDDLENBROOK an pathogenen und apathogenen Mycobakterien.
Vet. med. Diss., München 1959
- 50.) SCHÜTZE, R.: J. Hyg. (Brit.) 20, 335 (1921)
- 51.) SEIFERT, W.: Untersuchungen über die Variabilität boviner Tuberkelbazillen.
Z. Immunforsch. 74, 116 (1932)

- 52.) STAMATIN, N. et
TOMESCU, V.:
Recherches sur la virulence smooth et
rough du bacille tuberculeux aviaire.
Société de biologie de Bucarest,
Séance du 3 février 1938, Tome CXXVII
Année, page 1348
- 53.) STOLL, L.:
Die Neutralrotreaktion nach DUBOS in
der Tuberkulose-Diagnostik.
Mh. Vet. Med. 9, 278 (1954)
- 54.) SZULGA, MADRA,
KOWALCZYK:
Studies on differentiation of tubercle
bacilli isolates from human beings,
cattle and poultry.
Arch. immunol. et therap. (Warschau)
- 55.) WAGNER, K. und
MITSCHERLICH, E.:
Zwei neue Nährböden zur kulturellen
Differenzierung der Tuberkelbakterien-
typen.
Tuberkulose-Arzt 5, 275 (1951)

Herrn Professor Dr. A. Mayr danke ich für die Überlassung
des Themas dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Th. Schliesser möchte ich für die je-
derzeit freundlich gewährte Unterstützung meinen ergebensten
Dank sagen.

Lebenslauf

Am 1. August 1938 wurde ich, Annemarie Cölle, als Tochter des Apothekers Hans-Heinrich Cölle und seiner Ehefrau Katharina, geb. Bock, in Eisleben geboren. Bald darauf zogen meine Eltern nach Allenstein/Ostpreussen.

Mein Vater fiel 1943. Als die Russen 1945 Ostpreussen besetzten, flüchtete meine Mutter mit meinem jüngeren Bruder und mir nach Einbeck/Hann., wo ich 1946 eingeschult wurde. Da meine Mutter ab 1947 an der Universität Göttingen Philologie studierte, lebten wir bis zu ihrem Staatsexamen 1949 dort.

Von 1949 bis 1953 wohnten wir in Worpswede, und ich besuchte die dortige Mittelschule. Seit 1953 ist Rotenburg/Hann. unser Wohnsitz. 1952 wurde ich Schülerin des Kippenberg-Gymnasium in Bremen, das ich 1958 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin; legte im Sommersemester 1959 den ersten und im Wintersemester 1959/60 den zweiten Teil der Tierärztlichen Vorprüfung ab. Im März 1963 beschloß ich mein Studium mit dem Staatsexamen. Seit April 1963 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere an meiner Doktorarbeit.

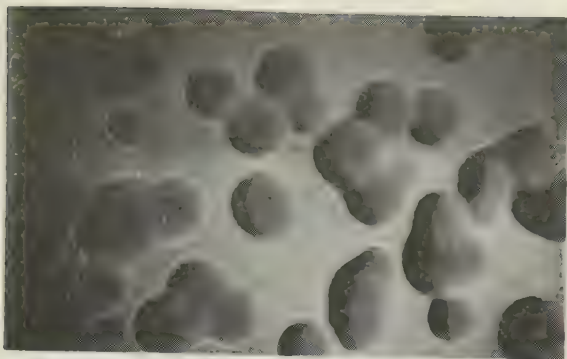


Abb. 1 Stamm Av 1 glatte Wuchsform (S)

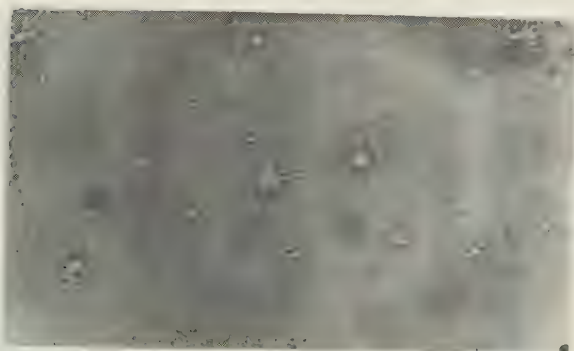


Abb. 2 Stamm Av 1 raue Variante (Sr)



Abb. 3 Stamm Av 1 glatte Wuchsform und raue Variante (S und Sr)

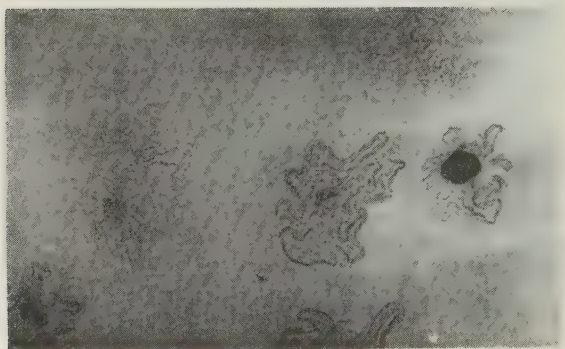


Abb. 4 Stamm Av 56 rauhe Wuchsform (R)

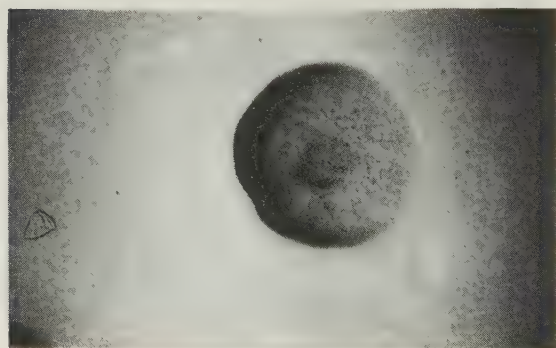


Abb. 5 Stamm Av 56 glatte Variante (Rs)

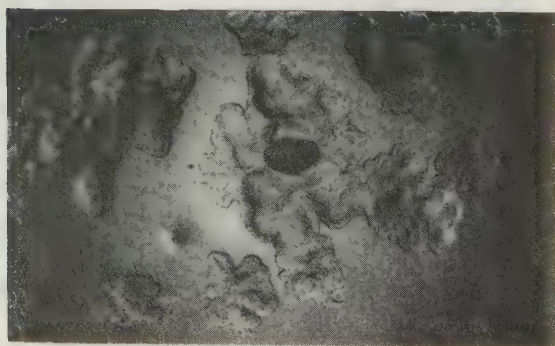


Abb. 6 Stamm Av 56 abweichende R-Variante

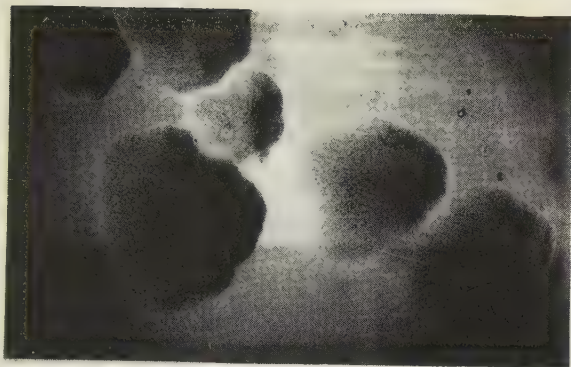


Abb. 7 Stamm Av 56 abweichende Rs-Variante

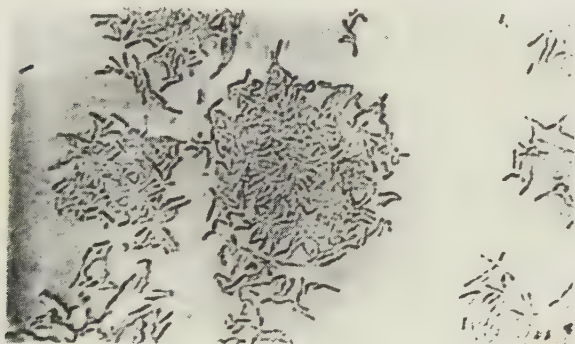


Abb. 8 Mikrokultur, Stamm Av 1, 3 Tage alt, glatte Form



Abb. 9 Mikrokultur, Stamm Av 56, 3 Tage alt, rauhe Form

